

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Structure génétique de populations montréalaises de  
salamandres cendrées (*Plethodon cinereus*) et de salamandres à  
points bleus (*Ambystoma laterale*)**

par

Sarah Noël-Boissonneault

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph. D.)  
en sciences biologiques

Juin, 2009

© Sarah Noël-Boissonneault, 2009



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Structure génétique de populations montréalaises de salamandres cendrées (*Plethodon cinereus*) et de salamandres à points bleus (*Ambystoma laterale*)

présentée par :

Sarah Noël-Boissonneault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Bernard Angers, président-rapporteur

François-Joseph Lapointe, directeur de recherche

Jacques Brisson, membre du jury

Dany Garant, examinateur externe

Paul Comtois, Représentant du doyen de la FESP

## Résumé

---

La population humaine a connu une augmentation sans précédent au cours des derniers siècles. Parallèlement à cette croissance démographique, on observe une concentration de plus en plus importante de la population dans les villes. Les agglomérations urbaines sont donc en pleine expansion, au détriment des espaces naturels à l'intérieur et aux alentours des villes. Bien que l'urbanisation représente une menace sérieuse pour la biodiversité, très peu d'études en biologie de la conservation ont été réalisées en milieu urbain. Ma thèse porte sur la structure génétique des populations de deux espèces de salamandres dans un milieu fortement urbanisé, soit la ville de Montréal. Le premier volet de mes travaux s'intéresse à la salamandre cendrée (*Plethodon cinereus*). Une analyse comparative de six locus microsatellites a été effectuée pour des populations isolées du Mont-Royal, un habitat hautement fragmenté, et des populations du Mont-Mégantic, un habitat continu. Les résultats indiquent que le flux génique est réduit entre les populations du Mont-Royal, et qu'elles sont soumises à l'érosion de la diversité génétique par le biais de la dérive génique. L'analyse de dix populations montréalaises et de deux populations situées sur des îles voisines a également révélé une forte différenciation génétique entre les populations de Montréal et celles des îles adjacentes. Bien qu'il ne semble pas y avoir de structure génétique forte à l'échelle de l'île de Montréal, trois populations situées près du centre-ville, sur le Mont-Royal, sont clairement différenciées les unes des autres. Ces populations ont probablement des tailles efficaces très réduites depuis de nombreuses années, ce qui favorise la dérive génique et la différenciation. Le deuxième volet de mon doctorat porte sur la salamandre à points bleus (*Ambystoma laterale*). Cette espèce fait partie du complexe *Ambystoma* qui regroupe également la salamandre de Jefferson (*Ambystoma jeffersonianum*) et des salamandres unisexuées de différents niveaux de ploïdie. Dans un premier temps, une méthode moléculaire basée sur l'analyse de l'ADN mitochondrial fut développée afin de distinguer les deux espèces

bisexuées des unisexuées. L'analyse de six locus microsatellites pour quatre populations en milieu protégé et une à Montréal, a ensuite été effectuée. Les résultats révèlent que la fréquence de *A. laterale* et des génotypes des unisexuées varie considérablement entre les populations. L'une des populations analysée semble être constituée uniquement de salamandres unisexuées LJ, ce qui soulève certaines questions quant au mode de reproduction employé dans cette population. Finalement, la population située dans un milieu urbain présente une faible diversité génétique, et certaines hypothèses sont amenées pour tenter d'expliquer cette situation.

**Mots-clés :** Complexe *Ambystoma*, conservation, diversité génétique, flux génique, fragmentation de l'habitat, génétique des populations, identification moléculaire, microsatellites, salamandres unisexuées, urbanisation

## Abstract

---

The human population has experienced an unprecedented growth in recent centuries. Along with this demographic boom, there is a increasing proportion of the population now living in cities. Urban areas are thus expanding at the expense of natural areas in and around cities. Although urbanization represents a serious threat to biodiversity, very few studies in conservation biology have been carried out in urban areas. My thesis focuses on the genetic structure of populations of two species of salamanders in a highly urbanized landscape: the city of Montréal. The first part of my work concentrates on the red-backed salamander (*Plethodon cinereus*). A comparative analysis of six microsatellite loci was performed for isolated populations from the Mont-Royal, a highly fragmented habitat, and populations from the Mont-Mégantic, a continuous habitat. The results indicate that gene flow is reduced among the Mont-Royal populations, which are subject to the erosion of genetic diversity through genetic drift. The analysis of ten red-backed salamander populations located on Montréal and on two nearby islands revealed a high degree of genetic differentiation among populations from Montréal and from neighboring islands. Although no clear genetic structure was detected within Montréal, genetic differentiation was observed at a small spatial scale for three populations located on the Mount Royal, near downtown. We believe that these populations had very low effective population size for a long time, allowing for fast genetic drift and subsequent population differentiation. The second part of my dissertation is about the blue-spotted salamander (*Ambystoma laterale*). This species is part of the *Ambystoma* complex, which also includes the Jefferson salamander (*Ambystoma jeffersonianum*) and unisexual salamanders of different levels of ploidy. In a first step, a molecular method based on the analysis of mitochondrial DNA was developed to distinguish the two bisexual species from unisexuals. The analysis of six microsatellite loci from five populations, including one from Montréal and others from preserved area was subsequently realized. Results revealed that

genomotype frequencies vary greatly among populations. One of the populations analyzed appears to be composed only of LJ unisexual salamanders, which raises some questions about the mode of reproduction used in this population. Finally, the population located in an urban environment presents a low genetic diversity, and some hypotheses are proposed to explain this situation.

**Key words :** *Ambystoma* complex, conservation, gene flow, genetic diversity, habitat fragmentation, microsatellites, molecular identification, population genetics, unisexual salamanders, urbanization

## Table des matières

---

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des symboles et abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xx
CHAPITRE 1.....	1
1.1 Urbanisation.....	1
1.2 Effets de la fragmentation sur les populations.....	3
1.2.1 Endogamie.....	3
1.2.2 Dérive génique.....	5
1.2.3 Goulot d'étranglement.....	5
1.2.4 Dynamique des populations fragmentées.....	7
1.3 Diversité génétique.....	9
1.3.1 Importance de la génétique en conservation.....	9
1.3.2 Diversité génétique et aptitude.....	10
1.3.3 Potentiel adaptatif.....	11
1.4 Marqueurs moléculaires.....	12
1.4.1 Microsatellites.....	13
1.4.2 Fonction des microsatellites.....	13
1.4.3 Évolution des microsatellites.....	15
1.5 Montréal.....	17
1.5.1 Urbanisation.....	17
1.5.2 Espaces verts.....	18



1.5.3 Biodiversité.....	18
1.6 Les amphibiens .....	19
1.6.1 La salamandre cendrée .....	21
1.6.1.1 Taxonomie .....	21
1.6.1.2 Écologie .....	22
1.6.2 La salamandre à points bleus.....	24
1.6.2.1 Taxonomie .....	24
1.6.2.2 Écologie .....	26
1.6.2.3 Vertébrés unisexués.....	27
1.6.2.4 Complexe <i>Ambystoma</i> .....	30
1.7 Organisation de la thèse .....	33
CHAPITRE 2 .....	35
2.1 Résumé .....	35
2.2 Abstract .....	35
2.3 Introduction .....	36
2.4 Methods.....	39
2.4.1 Sampling.....	39
2.4.2 Genotyping .....	40
2.4.3 Analyses.....	42
2.5 Results .....	43
2.6 Discussion.....	48
2.6.1 Population differentiation.....	48
2.6.2 Genetic diversity .....	49
2.7 Acknowledgements.....	51
CHAPITRE 3 .....	53
3.1 Résumé .....	53
3.2 Abstract .....	54
3.3 Introduction .....	55

3.4 Methods.....	58
3.4.1 Study area.....	58
3.4.2 Sampling.....	58
3.4.3 Molecular analyses.....	61
3.5 Results.....	64
3.5.1 Montréal island.....	66
3.5.2 Ile-Bizard and Ile-Perrot.....	69
3.6 Discussion.....	72
3.6.1 Insularization.....	72
3.6.2 Within Montréal.....	73
3.6.3 Genetic diversity in urban populations.....	76
3.7 Acknowledgments.....	77
CHAPITRE 4.....	78
4.1 Résumé.....	78
4.2 Abstract.....	79
4.3 Introduction.....	79
4.4 Materials and methods.....	81
4.5 Results.....	82
4.6 Discussion.....	85
4.7 Material Examined.....	86
4.8 Acknowledgments.....	87
CHAPITRE 5.....	88
5.1 Résumé.....	88
5.2 Abstract.....	89
5.3 Introduction.....	89
5.4 Methodology.....	92
5.4.1 Sampling.....	92
5.4.2 DNA extraction and amplification.....	94

5.4.3 Data analyses .....	94
5.5 Results .....	96
5.5.1 Population composition.....	96
5.5.2 Population differentiation.....	97
5.5.3 Genetic diversity .....	97
5.6 Discussion.....	101
5.7 Acknowledgements.....	107
CHAPITRE 6 .....	108
6.1 Les salamandres cendrées du Mont-Royal.....	108
6.2 Les salamandres cendrées de Montréal.....	109
6.3 Neutralité des microsatellites.....	110
6.4 Identification des salamandres unisexuées.....	111
6.5 Distribution des génotypes et urbanisation.....	112
6.6 La conservation en milieu urbain.....	114
Bibliographie.....	116

## Liste des tableaux

---

<b>Table 2.1</b> Sample sizes (n), number of private alleles and estimates of genetic diversity averaged over all microsatellite loci for the populations of eastern red-backed salamanders ( <i>Plethodon cinereus</i> ) sampled from a fragmented habitat (Mount Royal) and a continuous habitat (Mount Mégantic).....	45
<b>Table 2.2</b> Pairwise $F_{ST}$ values (upper triangular matrix) and probabilities of exact population differentiation tests (lower triangular matrix) for the four eastern red-backed salamander ( <i>Plethodon cinereus</i> ) populations of the Mount Royal. All tests were performed with 10 000 permutations. Significant tests at the 0.05 level are indicated with an asterisk. ....	46
<b>Table 2.3</b> Analysis of molecular variance (AMOVA) assessing the genetic structure of eastern red-backed salamander ( <i>Plethodon cinereus</i> ) populations from Mount Royal and Mount Mégantic. The probabilities were assessed with 10 000 permutations. ....	46
<b>Table 2.4</b> Results of assignment tests. For each population (rows), the number of individuals assigned to a population (columns) is indicated, along with the success rate (%) of assignment. ....	47
<b>Table 3.1</b> Coordinates, status, park size, habitat size, km of trails and number of visitors annually for interval for 10 populations of red-backed salamanders sampled from the Montréal island and from Ile-Bizard and Ile-Perrot. ....	60
<b>Table 3.2</b> Sample size (n), frequency of the lead-backed morph, mean number of alleles per locus (k), number of private alleles (p), allelic richness (A), observed ( $H_0$ ) and expected heterozygosity ( $H_E$ ) and coefficient of inbreeding( $F_{IS}$ ) with 95% confidence interval for 10 populations of red-backed salamanders sampled from the Montréal island and from Ile-Bizard and Ile-Perrot. ....	65

**Table 3.3** Pairwise  $F_{ST}$  values (below the diagonal) and associated significance probability estimates based on 10 000 permutations (above the diagonal). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  .....67

**Table 5.1** Alleles exhibited at six microsatellite loci for five populations of the *Ambystoma* complex. Alleles known to be exclusively from *A. laterale* genome are shown in bold while alleles known to be exclusively from *A. Jeffersonianum* are shown in italic. For unisexu- als, all unique multilocus genotypes encountered are presented, and alleles that differ from the main genotype are underlined. Since all LL salamanders had a unique multilocus genotype, only the alleles present in each population are shown.....98

**Table 5.2** Number of individuals, mean number of alleles per locus ( $k$ ), number of private alleles ( $p$ ), allelic richness ( $A$ ), observed heterozygosity ( $H_O$ ), allelic diversity ( $D$ ), the ratio of unique multilocus genotypes ( $G:N$ ), effective number of clones (ENC), genotypic diversity (CE) and genotypic evenness (CE) for populations of *A. laterale* and related unisexu- als sampled in southern Québec..... 102

## Liste des figures

---

- Figure 1.1** Dérive génique dans des populations du Tribolium rouge de la farine (*Tribolium castaneum*) de tailles variées. Chacune des populations initiales a une fréquence de 0,5 pour l'allèle b+ d'un gène biallélique contrôlant la coloration du corps. L'augmentation de la fréquence de l'allèle b+ après 20 générations dans presque toutes les populations est due à l'avantage sélectif de cet allèle (illustration modifiée de Rich et al. 1979). .....6
- Figure 1.2** Modèles de structure de populations fragmentées. a) modèle source-puits où tous les immigrants proviennent d'une grande population source. b) modèle où la migration est équivalente pour toutes les populations de taille égale. c) modèle linéaire dans lequel il n'y a du flux génique qu'entre les populations voisines. d) modèle linéaire à deux dimensions. e) métapopulation où les taches d'habitat occupées sont représentées par des cercles noirs et les taches d'habitat inoccupées par des cercles vides (illustration tirée de Frankham et al. 2002). .....8
- Figure 1.3** Illustration de trois allèles d'un microsatellite à motif AT. Les régions flanquantes sont représentées en gris et la position des amorces est indiquée en quadrillé..... 14
- Figure 1.4** Glissement de la polymérase lors de la réplication des microsatellites. Selon le brin qui sera replié lors de la réassociation, le glissement provoquera une augmentation ou une diminution du nombre de répétitions, représentées ici par des flèches (illustration modifiée de Strand et al. 1993). ..... 16
- Figure 1.5** Illustration des deux patrons de coloration les plus courants chez la salamandre cendrée : la forme rayée (en haut) et la forme à dos de plomb (en bas). Photo © Martin Ouellet. ....23
- Figure 1.6** Salamandre à points bleus. ....25

- Figure 1.7** Modes de reproduction des vertébrés asexués A) Dans la gynogenèse, la femelle unisexuée pond un œuf non réduit qui se développe sans la présence de sperme et la progéniture est identique à la mère (clones). B) Lors de la gynogenèse, le spermatozoïde ne sert qu'à activer le développement de l'œuf. Le matériel génétique du mâle n'est pas incorporé et les jeunes sont également des clones. C) Lors de l'hybridogenèse, l'œuf produit par une femelle diploïde hybride contient uniquement le génome d'une des deux espèces parentales qui est transmis sans recombinaison, alors que le génome de la seconde espèce parentale est évacué. Il y a ensuite fécondation par le sperme et développement de l'œuf. Ce mode de reproduction implique donc la transmission clonale d'un génome, tandis que l'autre génome est acquis par reproduction sexuée.....28
- Figure 1.8** Aires de distribution de la salamandre à points bleus (A) et de la salamandre de Jefferson (B). Les flèches représentent des populations retrouvées dans des aires discontinues. Illustration tirée de Petranka 1998.....32
- Figure 2.1** Map of eastern North America with inserts showing the populations of the eastern red-backed salamander (*Plethodon cinereus*) sampled from the fragmented habitat of the Mount Royal (A) and the continuous habitat of the Mount Mégantic (B). .....41
- Figure 3.1** Map of eastern North America with insert showing the Montréal archipelago on the St-Lawrence River (sampled islands indicated in black) and the location of the 12 red-backed salamander populations analyzed in this study (A: Anse-à-l'Orme, C: Cap-St-Jacques, IB: Ile-Bizard, IP: Ile-Perrot, L: Bois-de-Liesse, N: Angell Woods, O: Oratoire, P: Pointe-aux-Prairies, Pa: Parc, R: Arboretum, S: Summit, U: Université).59
- Figure 3.2** Neighbor-joining tree derived from chord distances among 12 red-backed salamander populations sampled from the Montréal agglomeration with bootstrap values indicated along the branches. See Figure 3.1 for population abbreviations..... 70
- Figure 3.3** Results of the clustering analysis implemented in Structure for  $k = 2$ . See Figure 3.1 for population abbreviations.....71

<b>Figure 4.1</b> Result of the multiplex-PCR showing the universal universal 258-bp fragment and the 113-bp band specific to unisexuals. LL : <i>Ambystoma laterale</i> , U : unisexual, 100 pb : 100 base pair ladder standard.....	84
<b>Figure 5.1</b> Known range of unisexual <i>Ambystoma</i> in eastern North America (grey area) with insert showing the sampled populations with associated genomotype frequencies of <i>A. laterale</i> (LL) and unisexuals (LJ, LLJ, LLLJ).....	93
<b>Figure 5.2</b> Proportion of unique multilocus genotypes (G:N) observed for 1-6 microsatellites used to determine genotypes for <i>A. laterale</i> (LL), diploid and triploid unisexuals (LJ and LLJ).....	103
<b>Figure 6.1</b> Évolution de la proportion d'articles publiés dans <i>Biological Conservation</i> et <i>Conservation Biology</i> où le mot <i>urban</i> était indexé dans les mots-clés pour les années 1979 à 2008. ....	115



## Liste des symboles et abréviations

---

A	Allelic richness
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AMOVA	Analysis of molecular variance
b	Regression coefficient
bp	Base pair
$\chi^2$	Chi-square
°C	Degree Celsius
CD	Genotypic diversity
CE	Genotypic evenness
cm	Centimètre, centimeter
COSEWIC	Comitee on the status of endangered wildlife in Canada
D	Allelic diversity
DDT	Dichloro-diphenyl-trichloroethane
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
ENC	Effective number of clones
FESP	Faculté des études supérieures et postdoctorales
$F_{IS}$	Inbreeding coefficient
$F_{ST}$	Genetic differentiation measure
FQRNT	Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies
G:N	Proportion of unique multilocus genotypes
ha	Hectare
$H_E$	Expected heterozygosity

$H_o$	Observed heterozygosity
IAM	Infinite alleles model
ID	Identification
IUCN	International Union for the Conservation of Nature
k	Mean number of alleles per locus, cluster
KAM	K-alleles model
km	Kilometer
LEMEE	Laboratoire d'écologie moléculaire et d'évolution
m	Mètre, meter
MC	Longueur museau-cloaque
MCMC	Markov chain Monte Carlo
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
mm	Millimètre
mM	Micromolar
$\mu$ l	Microlitre
$\mu$ M	Micromolar
n	Sample size
ng	Nanogram
NSERC	Natural sciences and engineering research council of Canada
p	Number of private alleles
$P$	Probability
pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
pmol	Picomole
r	Correlation coefficient
$R^2$	Coefficient of determination
RAPD	Random amplified polymorphic DNA

RFLP	Restriction fragment length polymorphism
s	Second
SMM	Stepwise mutation model
SNP	Single nucleotide polymorphism
TPM	Two-phase model
U	Unit
UNCDB	United Nations common database
UNFPA	United Nations Population Fund
UV	Ultraviolet

*« Let's start indoors. Let's start by imagining a fine Persian carpet and a hunting knife. The carpet is twelve feet by eighteen, say. That gives us 216 square feet of continuous woven material. Is the knife razor-sharp? If not, we hone it. We set about cutting the carpet into thirty-six equal pieces, each one a rectangle, two feet by three. Never mind the hardwood floor. The severing fibers release small tweaky noises, like the muted yelps of outraged Persian weavers. Never mind the weavers. When we're finished cutting, we measure the individual pieces, total them up - and find that, lo, there's still nearly 216 square feet of recognizable carpetlike stuff. But what does it amount to? Have we got thirty-six nice Persian throw rugs? No. All we're left with is three dozen ragged fragments, each one worthless and commencing to come apart. »*

The song of the dodo : island biogeography in an age of extinctions, David Quammen  
(1997)

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche pour son soutien tout au long de ces nombreuses années. François, merci pour ta disponibilité et ton écoute. J'ai toujours senti que tu étais là, autant lors des bons coups que pendant les moments plus difficiles ou les rushs de dernière minute. Tu as su m'épauler et m'encourager, toujours avec une solution ou un plan B pour pallier aux embûches, changements de projets et autres imprévus. Merci aussi pour toute la liberté accordée pour me permettre de réaliser des projets personnels à travers mon doctorat. Un directeur comme toi, ça n'a pas de prix!

Je tiens également à remercier Nathalie : assistante de recherche, collaboratrice, aide de terrain, mère Teresa à ses heures, cuisinière, mais surtout une présence incontournable au LEMEE. Ta bonne humeur continuelle et ton rire éclatant ont contribué à faire de mon séjour au labo une expérience formidable. Je ne saurais passer sous silence l'apport des autres membres du labo que j'ai côtoyés pendant ces nombreuses années : Sébastien, Véronique, Anaïs, Yong, Isabelle, Claudine, Olivier. Merci à chacun d'entre vous d'avoir été là, tout simplement, et d'avoir contribué à faire du labo un milieu de travail aussi agréable. Merci également à Louise, la « maman » du labo qui a su veillé sur moi et ma petite famille tout au long de mes études à l'UdeM. Je désire également remercier Diane Lacasse au secrétariat pour la facilitation des procédures administratives.

Je désire également remercier les gens de mon entourage pour leur support. Merci à Anne-Marie pour toutes les conversations éclairantes, à la famille Millier-Amarasekera pour le petit coup de main de dernière minute, à Pedro et Denise pour m'avoir aidé à me procurer le meilleur outil de travail possible, et à ma mère Monique, pour avoir toujours

cru en moi et n'avoir jamais remis en question mon choix de carrière. Un grand merci également à Pierrot. Je ne saurais te dire à quel point ta présence à mes côtés, tes encouragements et ta compréhension m'ont été plus que précieux, je t'en remercie infiniment. Merci également à mes enfants : Flavie, petite citerne à bonheur qui ensoleille chacune de mes journées, ainsi que Petit Pois, petite vie qui grandit en moi et qui m'a donné la motivation nécessaire pour les derniers miles de cette aventure doctorale.

Je souhaite finalement remercier les organismes subventionnaires qui, par le biais de bourses, ont permis la réalisation de ce projet : le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG), le Fonds Québécois de Recherches sur la Nature et les Technologies (FQRNT), la fondation Marc Bourgie, la faculté des études supérieures et postdoctorales ainsi que le département de sciences biologiques. Un grand merci également au réseau Apogee-Net, et tout spécialement à Inge, Hélène et Ghislaine qui m'ont permis d'élargir mes horizons.

# CHAPITRE 1

## Introduction

---

Mes travaux de doctorat portent sur la structure génétique des populations de deux espèces de salamandres dans un milieu fortement urbanisé, soit la ville de Montréal. L'introduction qui suit présente tout d'abord le processus d'urbanisation ainsi que ses conséquences néfastes, particulièrement au niveau des mécanismes qui mènent à une baisse de la diversité génétique au sein des populations. J'aborde ensuite l'importance de la diversité génétique en conservation et je présente les marqueurs utilisés pour la mesurer. Finalement, je décris la situation de Montréal et les organismes étudiés, soit la salamandre cendrée (*Plethodon cinereus*) et la salamandre à points bleus (*Ambystoma laterale*).

### 1.1 Urbanisation

La population humaine a connu une croissance sans précédent au cours des derniers siècles pour atteindre 6 milliards d'individus en octobre 1999 (UNFPA 1999). Parallèlement à cette croissance démographique, on observe une concentration de plus en plus importante de la population dans les villes. Au cours de la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle, la proportion de la population mondiale qui habite les villes a augmenté continuellement, passant de 29% en 1950 à 47% en 2000 (United Nations Population Division 2004). Depuis 2008, c'est plus de la moitié de la population mondiale qui habite dans les grands centres urbains (UNFPA 2007). Le taux d'urbanisation est particulièrement élevé en Afrique et en Asie, où l'on estime que la population urbaine aura doublé entre 2000 et 2030, année où les habitants des villes des pays en voie de développement représenteront plus de 80% de la population urbaine mondiale (UNFPA 2007). C'est toutefois dans les pays développés que l'on retrouve actuellement la plus grande proportion de la population dans les centres urbains (73,9%, Cohen 2006). Au Canada, plus de 81% de la population se retrouve dans les villes et cette proportion devrait atteindre 87% en 2030 (UNCDB 2005).

L'accroissement de la population urbaine va de pair avec le développement des villes. Au début du XIX<sup>e</sup> siècle, il n'existait que 16 villes avec plus d'un million d'habitants, alors qu'aujourd'hui elles sont plus de 400. Les agglomérations urbaines sont donc en pleine expansion, au détriment des espaces naturels à l'intérieur et aux alentours des villes. Par conséquent, la croissance des centres urbains a de nombreux effets négatifs sur les écosystèmes. L'urbanisation modifie le climat (Hua et al. 2008, Lin et al. 2008, Trusilova et al. 2008) et elle représente une source importante de pollution atmosphérique, aquatique et pédologique (Duh et al. 2008, Pouyat et al. 2008). En modifiant les caractéristiques de l'habitat, l'urbanisation affecte également la composition des communautés en favorisant les espèces plus adaptées à ces nouvelles conditions (Slawski et al. 2008, Vallet et al. 2008). L'urbanisation favorise également l'introduction d'espèces exotiques (McKinney 2002, 2006; Tait et al. 2005) et réduit la richesse spécifique (Paul & Meyer 2001). De plus, la perte d'habitat causée par l'urbanisation est d'une ampleur considérable et représente la principale cause de mise en péril des espèces terrestres aux Etats-Unis (Czech et al. 2000). Il s'agit donc un élément essentiel à considérer lorsque l'on s'intéresse à la conservation. Pourtant, très peu d'études en biologie de la conservation sont effectuées en milieu urbain (Miller & Hobbs 2002).

Les populations animales en milieu urbain sont sujettes à de nombreuses perturbations telles que la prédation et la compétition par des espèces envahissantes ou des animaux domestiques, l'exposition à des maladies ou encore le dérangement créé par les activités récréotouristiques (Hamer & McDonnell 2008). De plus, pour plusieurs espèces la matrice urbaine représente un habitat inhospitalier et les populations sont restreintes aux quelques espaces verts résiduels qui leur servent de refuges (Fernandez-Juricic 2001). Ces populations animales ont donc une distribution fragmentée au sein de l'espace urbain. En raison des effets négatifs qu'elle a sur les populations (présentés à la section 1.2), la fragmentation constitue une problématique centrale en biologie de la conservation et elle



est considérée comme étant une sérieuse menace pour la biodiversité (Wilcox & Murphy 1985, Wiens 1996).

## **1.2 Effets de la fragmentation sur les populations**

La taille d'une population est généralement proportionnelle à celle de son habitat, c'est-à-dire à la fraction du paysage qui inclue les ressources nécessaires à sa survie et sa reproduction. Par exemple, si une espèce habite en milieu forestier, la taille de sa population en un endroit donné sera liée à la taille du milieu forestier qu'elle peut exploiter. Ainsi, la fragmentation de l'habitat est directement corrélée à une réduction de la taille des populations (Fahrig 2003). De plus, la fragmentation a un effet négatif sur la migration entre les populations. Les populations de petite taille et/ou isolées ainsi créées sont particulièrement sensibles à l'érosion de la diversité génétique et à la différenciation des populations par les processus suivants qui sont détaillés ci bas: l'endogamie, la dérive génique, le goulot d'étranglement, et la réduction du flux génique (Primack 2004). De plus, les petites populations ont de plus grandes probabilités d'extinction puisqu'elles sont plus vulnérables à la stochasticité démographique et environnementale.

### **1.2.1 Endogamie**

Dans une petite population, les possibilités de partenaires sont limitées et la reproduction entre individus apparentés, appelée endogamie ou plus communément consanguinité, devient rapidement inévitable. Les rejetons issus de croisements endogames ont une plus grande probabilité d'hériter des mêmes allèles de leurs deux parents puisque ceux-ci partagent un ancêtre commun très récent (Waser & Williams 2001). L'endogamie a donc pour effet d'augmenter la fréquence des homozygotes dans la population (Frankham et al. 2002). Les allèles nocifs récessifs ont ainsi plus de chance de se retrouver en deux copies chez un individu. On peut alors observer un phénomène de dépression de

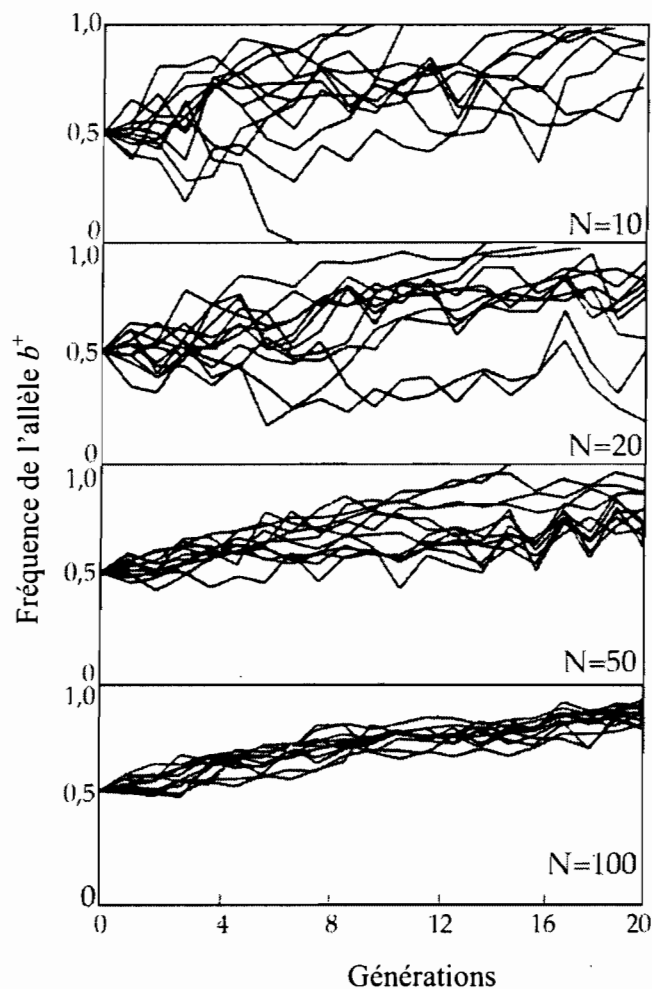
consanguinité (*inbreeding depression*), qui consiste en une diminution de l'aptitude (*fitness*) des individus consanguins (Falconer 1981). La dépression de consanguinité peut s'exprimer par l'altération de toute composante qui affecte l'aptitude comme l'augmentation du taux de mortalité juvénile, la diminution de la fécondité, de la taille des portées, du taux de croissance, et du taux de survie ou encore l'augmentation de la fréquence des malformations physiques (Ralls et al. 1979, 1988; O'Brien et al. 1985). Bien que la plupart des études sur la dépression de consanguinité aient porté sur des espèces domestiques, de laboratoire ou gardées en captivité (e.g. Wright 1977, Ralls et al. 1979, Ralls & Ballou 1983, Ralls et al. 1988), ce phénomène a également été établi pour des populations naturelles (Jiménez et al. 1994, Slate et al. 2000, Kruuk et al. 2002, Szulkin et al. 2007, Reid et al. 2008). Le cas des lions (*Panthera leo*) du cratère du Ngorongoro en Tanzanie est un exemple classique de dépression de consanguinité dans une population naturelle. La centaine de lions qui vit actuellement dans ce cratère sont issus de 17 individus seulement (Packer et al. 1991). Par comparaison avec les lions qui vivent dans les plaines du Serengeti avoisinantes, les lions du Ngorongoro présentent une plus faible hétérozygotie corrélée à une qualité de sperme plus faible (Wildt et al. 1987, Yuhki & O'Brien 1990). La dépression de consanguinité est en fait un mécanisme universel retrouvé chez pratiquement toutes les espèces (Lynch & Walsh 1998). En diminuant l'aptitude, l'endogamie contribue à augmenter les probabilités d'extinction, tel que démontré par des études de populations en captivité (Frankham 1995) et en milieu naturel (Saccheri et al. 1998). Il est à noter que l'endogamie peut également parfois avoir des effets positifs sur les populations par le biais de la purge des allèles délétères. En augmentant l'homozygotie, l'endogamie va exposer les allèles récessifs délétères à la sélection naturelle, ce qui peut contribuer à la réduction du fardeau génique (Crmokrak et al. 2002, Keller & Waller 2002).

### 1.2.2 Dérive génique

Les individus d'une population n'ont pas tous la même probabilité de se reproduire et de contribuer au bassin génique de la future génération. Seuls les individus qui se reproduisent constituent la population efficace. De plus, les reproducteurs ne transmettent qu'une partie de leur génome dans le cas de la reproduction sexuée. Il y a donc certains allèles qui ne sont pas transmis de génération en génération. La probabilité qu'un allèle rare soit transmis à la génération suivante est faible, alors qu'un allèle commun se fixera rapidement dans la population (Hartl 1980). La dérive génique consiste en un changement dans les fréquences alléliques d'une population dû à cet échantillonnage aléatoire des allèles (Halliburton 2004). Sur plusieurs générations, la dérive génique modifie les fréquences alléliques d'une population et entraîne une perte de la diversité génétique de la population. De plus, la dérive génique favorise la différenciation des populations. Une étude réalisée par Buri (1956) illustre bien la dérive génique. Lors de cette expérience, 107 populations de 16 mouches à fruit (*Drosophila melanogaster*) ont été suivies sur plusieurs générations. À la première génération, tous les individus étaient hétérozygotes pour un gène biallélique codant pour la couleur des yeux, un caractère neutre. Au fil des générations, les fréquences alléliques des différentes populations divergent de plus en plus et après 19 générations, près de la moitié des populations avaient perdu l'un ou l'autre des allèles. Tel qu'illustré à la Figure 1.1 pour une étude réalisée par Rich et al. (1979) sur le Tribolium rouge de la farine, la dérive génique est d'autant plus importante que la population est petite.

### 1.2.3 Goulot d'étranglement

La diminution rapide de l'effectif d'une population se nomme un goulot d'étranglement. Cette baisse drastique de l'effectif entraîne une perte de la diversité génétique puisque celle-ci est restreinte aux allèles portés par les individus qui échappent

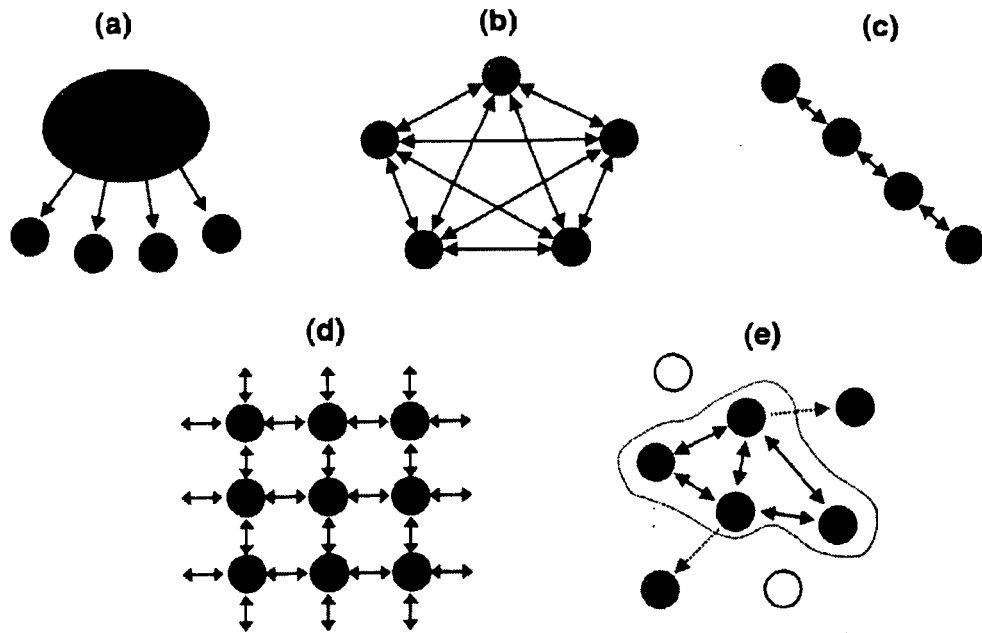


**Figure 1.1** Dérive génique dans des populations du Tribolium rouge de la farine (*Tribolium castaneum*) de tailles variées. Chacune des populations initiales a une fréquence de 0,5 pour l'allèle  $b^+$  d'un gène bi-allélique contrôlant la coloration du corps. L'augmentation de la fréquence de l'allèle  $b^+$  après 20 générations dans presque toutes les populations est due à l'avantage sélectif de cet allèle (illustration modifiée de Rich et al. 1979).

au goulot d'étranglement (Meffe & Carrol 1997). La perte de diversité génétique est fonction de l'ampleur du goulot d'étranglement, ainsi que du délai avant le retour à une taille de population normale. Ainsi, si la population conserve un faible effectif sur une longue période, la perte de diversité génétique sera plus importante en raison de la dérive génétique et de l'endogamie inhérente aux petites populations. Le cas de la Crécerelle de Maurice (*Falco punctatus*) est un exemple classique de goulot d'étranglement. Les effectifs de ce petit faucon endémique à l'île Maurice ont chuté rapidement en raison de l'utilisation massive du DDT à partir des années 1950 et de la perte de son habitat (Jones et al. 1994, Safford & Jones 1997). En 1974, la population a diminué jusqu'à comprendre un seul couple reproducteur en liberté (Frankham et al. 2002). Suite à un programme intensif de reproduction en captivité, de réintroduction et de soutien à la population, la Crécerelle de Maurice se porte maintenant relativement bien, avec plus de 500 oiseaux (Jones et al. 1994, Nicoll et al. 2004). Toutefois, cette population a eu des effectifs de moins de 50 individus pendant six générations consécutives, ce qui a laissé des traces. Des analyses microsatellites effectuées sur des individus vivants et des spécimens de musée ont montré que la population actuelle de la Crécerelle de Maurice présente une diversité génétique plus faible que la population présente avant le goulot d'étranglement : il y a eu une diminution de 55% de la diversité allélique et de 57% de l'hétérozygotie (Groombridge et al. 2000).

#### **1.2.4 Dynamique des populations fragmentées**

Lorsque les populations sont isolées, le flux génique est pratiquement inexistant. En absence d'immigration il n'y a pas d'apport de nouveaux allèles dans les populations, ce qui les rend d'autant plus sensibles à la dérive génétique et à l'endogamie. De plus, lorsqu'il n'y a plus d'échange entre les populations, celles-ci se différencient plus rapidement les unes des autres (Young et al. 1996). Selon la configuration spatiale des populations et la capacité de dispersion de l'espèce, les populations fragmentées peuvent être structurées selon cinq modèles présentés à la Figure 1.2.



**Figure 1.2** Modèles de structure de populations fragmentées. a) modèle source-puits où tous les immigrants proviennent d'une grande population source. b) modèle où la migration est équivalente pour toutes les populations de taille égale. c) modèle linéaire dans lequel il n'y a du flux génique qu'entre les populations voisines. d) modèle linéaire à deux dimensions. e) métapopulation où les taches d'habitat occupées sont représentées par des cercles noirs et les taches d'habitat inoccupées par des cercles vides (illustration tirée de Frankham et al. 2002).

Lorsque la colonisation d'un habitat est effectuée par un très petit nombre d'individus, le bassin génique de la population sera limité aux allèles portés par les individus colonisateurs. Ce processus, dont les effets sont comparables au goulot d'étranglement, est appelé effet fondateur (Mayr 1963). De manière générale, le nombre de fondateurs nécessaires afin de conserver une bonne part de la diversité génétique de la population d'origine est fonction du nombre et de la fréquence des allèles (Frankham et al. 2002). Par exemple, si un grand nombre d'allèles est présent et que plusieurs ont des fréquences très faibles, le nombre de fondateurs nécessaires afin de préserver une proportion équivalente d'allèles pour un gène donné sera plus important que s'il n'y a que quelques allèles communs dans la population. Lors de l'établissement de populations, il est recommandé que le nombre de fondateurs soit suffisamment élevé afin de retenir tous les allèles qui ont une fréquence de plus de 5% dans la population (Marshall & Brown 1975). À moins que le nombre de fondateurs soit très élevé, les allèles rares ont habituellement peu de chances d'être conservés. Afin de limiter l'effet fondateur lors de recolonisations, il est souhaitable que des corridors soient présents entre les populations de manière à faciliter les échanges et permettre à un plus grand nombre d'individus de coloniser l'habitat (Hanski 1999).

## **1.3 Diversité génétique**

### **1.3.1 Importance de la génétique en conservation**

L'importance des processus génétiques dans la perte de biodiversité a été proposée il y a près de 30 ans (Frankel & Soulé 1981). Or, ce concept fut remis en cause par Lande (1988), qui a en effet suggéré que les facteurs démographiques sont beaucoup plus importants pour la compréhension des processus menant à l'extinction que les facteurs génétiques. Ainsi, les catastrophes naturelles ainsi que les fluctuations démographiques et environnementales causeraient l'extinction bien avant que l'érosion de la diversité

génétique ne devienne une menace réelle à la survie des espèces. Or, plusieurs études ont démontré les effets négatifs d'une perte de diversité génétique dans les populations naturelles (voir exemples ci-dessous) et il est maintenant établi que les processus génétiques et démographiques interagissent pour déterminer la viabilité des populations (Frankham et al. 2002). La diversité génétique est d'ailleurs un des trois niveaux de biodiversité qu'il importe de protéger, les deux autres étant la diversité des espèces (c.a.d la richesse) et la diversité des écosystèmes (McNeely et al. 1990). Le maintien et/ou la quantification de la diversité génétique constitue souvent un des principaux objectifs des programmes de conservation (Milligan 1994) et représente un enjeu majeur en biologie de la conservation puisqu'elle est reliée à l'aptitude et au potentiel adaptatif des populations.

### **1.3.2 Diversité génétique et aptitude**

Tel que vu à la section 1.2.1 qui présente les effets de l'endogamie, l'aptitude d'un individu est étroitement reliée à son hétérozygotie. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que les individus possédant une diversité génétique plus importante ont également un meilleur taux de survie et de croissance ainsi qu'une meilleure résistance aux maladies (Allendorf & Leary 1986). Des corrélations ont été établies entre l'hétérozygotie et des traits reliés à l'aptitude entre autres chez les plantes, les mollusques et les vertébrés (David 1998). Un exemple classique de corrélation entre l'hétérozygotie et l'aptitude est le polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC). Ce complexe regroupe plusieurs gènes localisés sur un seul chromosome et qui sont impliqués dans la sélection sexuelle, la reconnaissance des individus apparentés et l'immunité (Acevedo-Whitehouse & Cunningham 2006). Puisque les individus hétérozygotes aux locus MHC présentent une plus grande diversité d'antigènes, on s'attend à ce qu'ils soient plus résistants aux maladies infectieuses. Il a d'ailleurs été démontré que les individus hétérozygotes aux locus MHC de classe I et II étaient plus résistants à l'hépatite B et au virus du SIDA (Thursz et al. 1997, Carrington et al. 1999).



### 1.3.3 Potentiel adaptatif

Les espèces évoluent dans un environnement changeant auquel elles doivent s'adapter pour survivre; c'est ce que l'on appelle l'évolution adaptative (Halliburton 2004). Pour qu'il y ait évolution adaptative, la variabilité génétique à l'intérieur d'une population est essentielle (Frankel 1974, Templeton 1994). Plus la diversité génétique à l'intérieur d'une population est élevée, plus celle-ci sera en mesure de faire face à un éventail élargi de conditions environnementales. Ceci fut démontré par une expérimentation où des mouches à fruits (*Drosophila melanogaster*) ont été génotypées pour un gène biallélique. Des populations monomorphes et polymorphes avec des fréquences alléliques différentes ont été placées dans des environnements pour lesquels les conditions de température, d'humidité et d'alimentation étaient différentes. Les résultats démontrent qu'en moyenne les populations polymorphiques avaient un taux de survie d'environ 10% supérieur aux populations monomorphiques en moyenne (Bijlsma-Meeles & van Delden 1974, Hedrick et al. 1976). De plus, les populations qui sont exposées à des conditions variables maintiennent une plus grande diversité génétique que les populations qui vivent dans des milieux homogènes, tel que démontré par une expérience sur une autre espèce de drosophiles (*Drosophila willitsoni*). Lors de cette expérimentation, des mouches à fruits ont été placées dans 13 cages pour lesquelles les conditions d'alimentation et de température pouvaient varier ou demeurer constantes. Après 15 générations, l'analyse de la diversité génétique pour 22 enzymes a révélé que les populations maintenues dans un environnement hétérogène possédaient un plus grand nombre d'allèles par locus et que l'hétérozygotie moyenne était également plus élevée (Powell 1971).

## 1.4 Marqueurs moléculaires

Les premières études de génétique des populations utilisaient des caractères morphologiques pour mesurer la diversité génétique et la différenciation des populations (Conner & Hartl 2004). Suite au développement technologique important dans le domaine de la biologie moléculaire à partir des années 1950, les généticiens se sont de plus en plus orientés vers les approches moléculaires qui sont moins invasives et permettent souvent de détecter de plus fines différences. Des marqueurs moléculaires sont régulièrement utilisés aujourd'hui pour identifier les populations les plus à risque, déterminer la structure des populations, définir des unités de gestion ou encore détecter l'hybridation (DeSalle & Amato 2004).

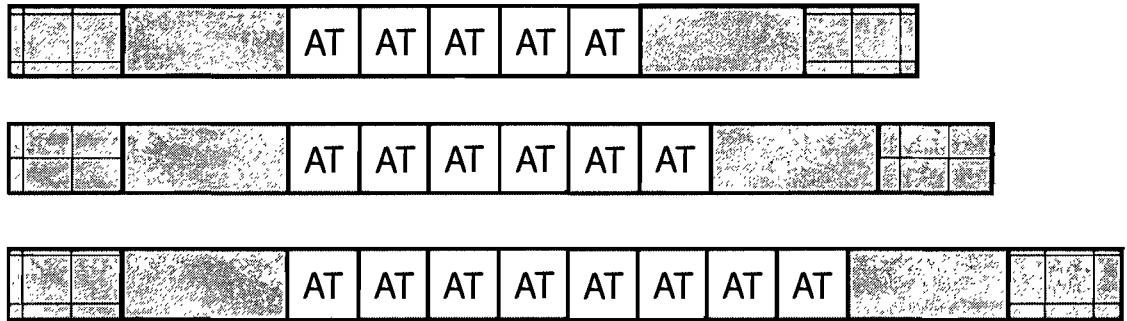
Les principales techniques moléculaires utilisées au cours des 50 dernières années sont nombreuses : les allozymes (Lewontin & Hubby 1966, Hubby & Lewontin 1966), les enzymes de restriction (restriction fragment polymorphism, RFLP, Avise et al. 1979), le séquençage (Kreitman 1983) l'amplification aléatoire d'ADN polymorphique (random amplified polymorphic DNA, RAPD, Welsh & McClelland 1990, Williams et al. 1990), le polymorphisme résultant de l'amplification de fragments de longueur variable (amplified fragment length polymorphism, AFLP, Vos et al. 1995), le polymorphisme nucléotidique simple (single nucleotide polymorphism, SNP, Morin et al. 2004) et les microsatellites (Hamada et al. 1982). Ces derniers sont aujourd'hui des marqueurs de prédilection pour les analyses de génétique des populations (Sunnucks 2000) et ont été choisis dans le cadre de ce projet de doctorat en raison de leur grande variabilité, de leur caractère codominant, de leur grande abondance dans le génome, de leur reproductibilité, et de la faible quantité d'ADN qui est nécessaire pour l'analyse (Powell et al. 1996).

### **1.4.1 Microsatellites**

Les microsatellites sont de courtes séquences d'habituellement moins de 100 pb composées d'un motif de deux à six nucléotides répété en tandem (Figure 1.3, Tautz & Renz 1984). Le nombre de répétitions est hautement variable selon les individus (Litt & Luty 1989, Tautz 1989, Weber & May 1989), et il peut y avoir jusqu'à 50 allèles par locus (DeWoody & Avise 2000). Les microsatellites sont présents dans les génomes de tous les organismes étudiés jusqu'à présent (Hamada et al. 1982, Tautz & Renz 1984, Hancock 1999) et sont habituellement retrouvés en grand nombre. On estime que chez les humains il y a un microsatellite à chaque 6000 pb, pour un total d'environ 500 000 locus (Beckman & Weber 1992). Il y a toutefois certains groupes taxonomiques où le nombre de microsatellites est plus faible, par exemple chez les plantes où il y en aurait cinq fois moins que chez les vertébrés (Lagercrantz et al. 1993). Afin d'exploiter l'information contenue dans ces locus, les microsatellites sont amplifiés par réaction de polymérase en chaîne (PCR, Mullis & Faloona 1987) en utilisant des amorces qui se fixent dans les régions flanquantes du motif microsatellite (Figure 1.3). Ces amorces sont normalement développées spécifiquement pour chaque espèce, bien qu'il soit également possible d'utiliser des amorces conçues pour d'autres espèces lorsque les régions flanquantes sont conservées. Toutefois, la proportion de locus polymorphes diminue rapidement avec la distance phylogénétique (FitzSimmons et al. 1995).

### **1.4.2 Fonction des microsatellites**

La grande majorité des locus microsatellites est située dans les régions non codantes, soit dans les introns et dans les séquences intergéniques (Edwards et al. 1998, Toth et al. 2000). Il est donc généralement admis que les microsatellites sont sélectivement neutres (Schlötterer & Wiehe 1999, Scribner & Pearce 2000, Ellegren 2004). Certains microsatellites formés d'un motif de trois nucléotides font toutefois exception à cette règle



**Figure 1.3** Illustration de trois allèles d'un microsatellite à motif AT. Les régions flanquantes sont représentées en gris et la position des amorces est indiquée en quadrillé.

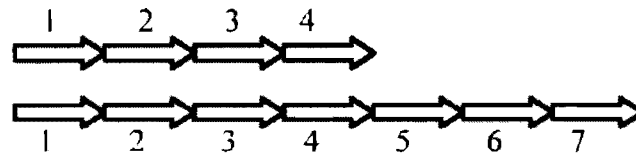
et sont associés à certaines maladies telles le syndrome du X fragile, la maladie de Huntington et la dystrophie myotonique (Sutherland & Richards 1995). Ces maladies sont généralement retrouvées lorsque le nombre de répétition du trinuécléotide est supérieur à un seuil critique (Nelson 1993).

### 1.4.3 Évolution des microsatellites

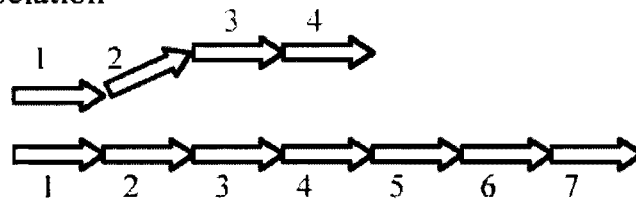
Les microsatellites ont un taux de mutation extrêmement élevé qui est estimé à  $10^{-2}$  à  $10^{-5}$  mutations/site/génération (Scribner & Pearce 2000). Ce taux de mutation varie selon plusieurs facteurs. Il a été montré que les microsatellites dinuécléotides évoluent plus rapidement que les trinuécléotides non reliés à des maladies, qui évoluent à leur tour plus rapidement que les tétranuécléotides (Chakraborty et al. 1997). Aussi, pour un même microsatellite, le taux de mutation n'est pas le même pour tous les allèles et augmente avec le nombre de répétitions (Brinkman et al. 1998, Ellegren 2000, Brohede et al. 2002). Cette observation est cohérente avec le mode de mutation des microsatellites. Celles-ci sont en effet causées par le glissement de la polymérase lors de la réplication (Figure 1.4, Levinson & Gutman 1987). Lorsque le nombre de répétitions est élevé, il y a alors plus de chance de qu'un glissement se produise lorsque le brin en cours de synthèse se dissocie distalement du brin mère. Il arrive ensuite qu'il se réassocie en étant mal aligné avec le brin mère, ce qui cause l'ajout ou la perte d'une répétition du motif microsatellite. La plupart de ces erreurs de réplication seront ensuite corrigées par le mécanisme de réparation des bases mal appariées, mais une faible partie des erreurs n'est pas détectée, ce qui crée les mutations des microsatellites (Strand et al. 1993).

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer l'évolution des microsatellites, les principaux étant le *stepwise mutation model* (SMM, Kimura & Ohta 1978), le *infinite alleles model* (IAM, Kimura & Crow 1964) et le *two-phase model* (TPM, Di Rienzo et al. 1994). Selon le SMM chaque mutation augmente ou diminue d'une seule répétition la

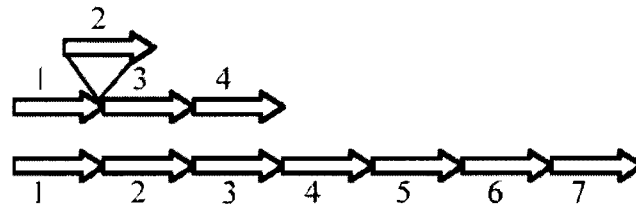
## Synthèse



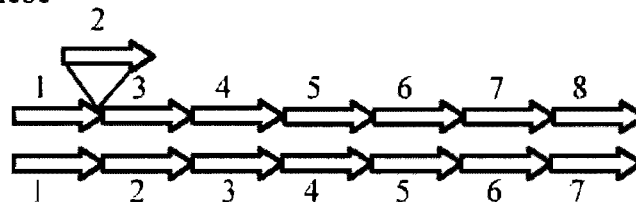
## Dissociation



## Glissement et réassociation



## Synthèse



**Figure 1.4** Glissement de la polymérase lors de la réplication des microsatellites. Selon le brin qui sera replié lors de la réassociation, le glissement provoquera une augmentation ou une diminution du nombre de répétitions, représentées ici par des flèches (illustration modifiée de Strand et al. 1993).

longueur du microsatellite, avec une probabilité égale dans les deux sens. Selon le IAM chaque mutation crée un nouvel allèle qui n'était pas présent auparavant dans la population en ajoutant ou en retirant un certain nombre de répétitions. Le TPM est quant à lui un dérivé du SMM qui permet des mutations impliquant l'ajout ou la délétion de plusieurs répétitions. Selon ce modèle, une proportion des mutations n'implique qu'une seule répétition (mutations simple-pas) alors que certaines mutations agiront sur plusieurs répétitions (mutations multi-pas).

Afin d'évaluer les différents modèles de mutation, on a recours à l'analyse des pedigrees. Dans la plupart des cas, des mutations simple-pas et multi-pas ont été observées, ce qui est en accord avec le modèle TPM. Toutefois, la proportion de mutations multi-pas varie considérablement selon les locus, le type de motif du microsatellite (dinucléotide, trinucleotide, tétranucleotide) et l'espèce. Par exemple, les études de pedigree chez l'humain ont démontré des proportions de mutations multi-pas allant de 4% à 63 % (Brinkmann et al. 1998, Huang et al. 2002). Chez d'autres espèces animales, cette proportion varie de 5% à 74% (Fitzsimmons 1998, Primmer et al. 1996, Primmer et al. 1998, Gardner et al. 2000, Beck et al. 2003).

## **1.5 Montréal**

### **1.5.1 Urbanisation**

La ville de Montréal représente un site approprié afin d'étudier les amphibiens en milieu urbain en raison de sa longue histoire de perturbations anthropiques. Des milliers d'années avant l'arrivée des premiers Européens, des groupes d'Amérindiens fréquentent déjà l'île (Robert 1994). C'est avec la fondation de Ville-Marie en 1642 que la région commença véritablement à se développer. La colonisation par les Européens transforma rapidement l'île, où la population augmenta de 20 fois en un siècle, passant de 407

habitants en 1660, à plus de 8000 en 1760 (Ville de Montréal 2007). Au début du XIX<sup>e</sup> siècle, Montréal évolue rapidement : les premières vagues d'immigration britannique créent une croissance démographique et un mouvement d'urbanisation important; Montréal devient alors une ville en voie d'industrialisation (Massicotte 1999). En 1871, la ville compte déjà plus de 100 000 habitants, et la population triple en seulement trois décennies (Linteau 2000). La croissance se poursuit par la suite et Montréal compte aujourd'hui plus de 1 800 000 habitants, ce qui la place au 15<sup>e</sup> rang des grandes agglomérations nord-américaines en ce qui a trait à la population. La densité moyenne y est de 3714,8 habitants/km<sup>2</sup> (Ville de Montréal 2007).

### **1.5.2 Espaces verts**

Montréal comprend près de 55 km<sup>2</sup> d'espaces verts, soit 11% de la superficie totale de l'île. Avec un ratio d'aussi peu que 1,92 ha of d'espace vert pour 1000 habitants, Montréal se classe avant-dernière parmi 14 grandes villes canadiennes (Lindsay 2004). De plus, ces espaces verts sont surtout composés de parcs de quartier et d'étendues gazonnées, et la forêt ne couvre que 0,8% de l'île (3,9 km<sup>2</sup>). Au cours des dernières années, on a observé une diminution importante de la superficie des boisés dans la région métropolitaine. De 1986 à 1994, 30% du couvert végétal et boisé fut perdu au profit de l'urbanisation, et de 1998 à 2005, 18 % des boisés privés ont disparu (François Cavayas, communication personnelle).

### **1.5.3 Biodiversité**

L'île de Montréal comprend néanmoins certains espaces verts de taille respectable qui constituent de véritables réservoirs de biodiversité au cœur de la matrice urbaine. Le Mont-Royal en est un bon exemple. Du haut de ses 233 m, le Mont-Royal domine la ville et en est une véritable figure emblématique. Afin de préserver le caractère de la montagne et sa prédominance dans le paysage urbain, le plan d'urbanisme de la ville prévoit d'ailleurs



des limites de hauteur pour les édifices à proximité. Ainsi, aucun immeuble des arrondissements de Westmount, Outremont et Ville-Marie ne peut dépasser le sommet de la montagne (Ville de Montréal 2004). Le Mont-Royal héberge à lui seul plus de 180 espèces d'oiseaux, 20 espèces de mammifères, 2 espèces d'amphibiens et 1 reptile (Landry 1999, Ouellet et al. 2004). Bien que le Mont-Royal soit classé depuis 2003 comme arrondissement historique et naturel par le gouvernement du Québec, il fait toujours face à la menace de développement résidentiel, tels que le récent projet de construction de près de 325 unités d'habitation sur l'ancien site du collège de Marianopolis. De plus, les trois millions de visiteurs annuels sur le Mont-Royal représentent une menace réelle et grandissante pour l'intégrité de la montagne.

Le réseau des parcs-nature de la Ville de Montréal est un autre exemple d'espaces verts résiduels de tailles respectables dans la matrice urbaine. Il comprend neuf parcs de 34 à 261 ha, dont six sont aménagés pour accueillir le public. On y retrouve des habitats riverains, des champs, des friches, des boisés et des marais qui abritent 23 espèces de mammifères, ainsi que 19 espèces de reptiles et d'amphibiens (Rodrigue 1998a, b). Parmi celles-ci on retrouve la tortue géographique (*Graptemys geographica*) qui est désignée vulnérable, ainsi que la couleuvre brune (*Storeria dekayi*) et la couleuvre tachetée (*Lampropeltis triangulum triangulum*), toutes deux susceptibles d'être désignées menacées ou vulnérables au Québec.

## 1.6 Les amphibiens

Les amphibiens comprennent 6482 espèces (AmphibiaWeb 2009) réparties en trois ordres : les gymnophiones (cécilies), les urodèles (salamandres) et les anoures (grenouilles et crapauds). L'origine de cette classe de vertébrés, dont les relations entre les ordres sont contestées (Zardoya & Meyer 2001, Meyer & Zardoya 2003, Zhang et al. 2003), remonterait au Paléozoïque (San Mauro et al. 2005, Zhang et al. 2005).

En 1989, lors du premier congrès mondial d'herpétologie, les scientifiques rapportent des faits inquiétants : une diminution des effectifs des populations d'amphibiens (Houlahan et al. 2000), la disparition de certaines populations (Blaustein & Wake 1990), la diminution de l'aire de répartition d'espèces (Beebee 1973), la raréfaction d'espèces autrefois communes (Phillips 1990), sans oublier l'extinction complète de certaines espèces (Griffiths & Beebee 1992). Puisque ces observations provenaient autant de milieux perturbés (e.g. Moyle 1973, Hayes & Jennings 1986) que de parcs nationaux et autres aires protégées (e.g. Tyler & Davies 1985, Lips 1998, Burrowes et al. 2004), les herpétologistes ont conclu à un déclin global des amphibiens (Barinaga 1990). Un état récent de la situation démontre que plus de 32% des espèces d'amphibiens sont menacées. Cette proportion étant plus grande que pour les mammifères (23%) ou les oiseaux (12%, Stuart et al. 2004), ces résultats indiquent que les amphibiens subissent un déclin plus important que d'autres taxons.

Bien qu'il n'existe pas de facteur unique connu expliquant la cause de tous les déclinés observés, plusieurs éléments pourraient y jouer un rôle. L'augmentation des radiations ultraviolettes causée par la détérioration de la couche d'ozone (Kiesecker & Blaustein 1995, Blaustein et al. 1998), les pluies acides et la pollution (Beebee et al. 1990, Kucken et al. 1994), l'exploitation par les humains (Stokstad 2004), l'introduction d'espèces exotiques (Moyle 1973, Hayes & Jennings 1986, Knapp & Matthews, 2000) et les changements climatiques (Pounds et al. 1999) sont tous des éléments qui pourraient jouer un rôle dans le déclin des amphibiens. Deux causes principales sont toutefois mises de l'avant : la chytridomycose qui est une maladie causée par un champignon pathogène (*Batrachochytrium dendrobatidis*, Berger et al. 1998, Rohr et al. 2008) ainsi que la modification de l'habitat, soit la destruction, la dégradation ou la fragmentation (Green 1997, Alford & Richards 1999, Dodd & Smith 2003).

Les amphibiens sont généralement considérés comme étant de bons indicateurs de l'état global de l'environnement. Puisque la peau des amphibiens est perméable, ils sont très sensibles aux contaminants environnementaux (Beebee 1996). De plus, la plupart d'entre eux nécessitent à la fois un habitat terrestre et humide et ont de faibles aptitudes à la dispersion (Alford & Richards 1999). Leur position élevée dans la chaîne alimentaire ainsi que leur importante biomasse sont également des caractéristiques qui les rendent sensibles aux changements environnementaux et faciles à échantillonner, deux critères importants pour être une bonne espèce indicatrice (Noss 1990, Vitt et al. 1990).

## **1.6.1 La salamandre cendrée**

### **1.6.1.1 Taxonomie**

La salamandre cendrée (*Plethodon cinereus*) est un urodèle de la famille des Plethodontidae. Cette famille, qui regroupe 391 espèces, constitue la plus grande famille de salamandres et elle comprend plus de 67% des espèces (AmphibiaWeb 2009). Les Plethodontidae sont retrouvés principalement dans le Nouveau Monde, avec des espèces distribuées du Canada jusqu'en Amérique Centrale. Deux genres sont également présents en Amérique du Sud et cinq espèces se retrouvent en Europe (Petranka 1998). Au Québec, on retrouve six espèces de Plethodontidae (Desroches & Rodrigue 2004). Les Plethodontidae n'ont pas de poumons et les échanges gazeux se font par le palais et la peau, qui doit toujours demeurer humide. Toutes les espèces possèdent un sillon naso-labial reliant l'œil et la lèvre supérieure et qui est caractéristique de cette famille (Petranka 1998). Ce sillon sert à transporter les signaux chimiques du substrat jusqu'à l'organe voméronasal afin de déclencher des comportements induits chimiquement (Dawley 1992). Plusieurs espèces de Plethodontidae peuvent pratiquer l'autotomie, c'est-à-dire l'ablation spontanée de la queue pour échapper à leurs prédateurs (Mueller et al. 2004). Les Plethodontidae se divisent en deux sous-familles, soit les Desmognathinae et les Plethodontinae qui se différencient par leur squelette et la taille de leur génome (Larson et al. 1984). Les

représentant du genre *Plethodon* sont repartis en deux lignées (orientale et occidentale) qui auraient divergé il y a environ 40 millions d'années (Highton & Larson 1979, Maxson et al. 1979).

### 1.6.1.2 Écologie

Parmi les amphibiens, la salamandre cendrée (*Plethodon cinereus*) est une des espèces indicatrices les plus fréquemment utilisée (e.g. Frisbie & Wyman 1995, Welsh & Droege 2001, Venier et al. 2007, Bazar et al. 2008). Cette petite salamandre (81 - 105 mm) vit sous les feuilles mortes, les pierres et les écorces des forêts tempérées du nord-est de l'Amérique du Nord (Conant & Collins 1998). Deux morphes sont présents dans la plupart des populations (Test 1952, Brown 1965, Williams et al. 1968, Highton 1977, Lotter & Scott 1977, Pflingsten & Walker 1978, Gibbs 1998a). La forme rayée est de couleur foncée avec une ligne rougeâtre qui s'étend de la tête jusqu'au deux tiers de la queue alors que les individus dits « à dos de plomb » sont dépourvus de cette ligne (Figure 1.5). Ce patron de coloration est déterminé génétiquement et pourrait être contrôlé par l'interaction de plusieurs gènes (Highton 1959, Highton 1975). Certains individus érythrisques entièrement rouges ainsi que des albinos sont également parfois retrouvés dans les populations (Reed 1908, Rosen 1971, Dyrkacz 1981). Comme tous les membres de la sous-famille des Plethodontinae, le stade larvaire de la salamandre cendrée se déroule à l'intérieur de l'œuf. Il s'agit donc d'une espèce entièrement terrestre qui n'a pas besoin du milieu aquatique pour se reproduire, les œufs étant pondus directement sous les pierres ou les bûches. Les jeunes éclosent de six à huit semaines après la ponte et demeurent avec la mère de une à trois semaines avant de se disperser (Highton 1959). La salamandre cendrée préfère les forêts matures humides (Grover 1998, Hyde & Simons 2001) et s'aventure rarement dans les habitats chauds et secs, bien qu'elle puisse traverser des milieux ouverts sur plus de 55 m (Larson et al. 1984, Marsh et al. 2004). L'abondance de la salamandre cendrée peut atteindre jusqu'à 2,8 individus/m<sup>2</sup> et il s'agit souvent de la salamandre la plus abondante en milieu forestier (Burton & Likens 1975, Jaeger 1979, Marsh & Beckman 2004). La taille de son territoire oscille entre 0,16 et 4,8 m<sup>2</sup> et ses mouvements quotidiens sont de l'ordre de



**Figure 1.5** Illustration des deux patrons de coloration les plus courants chez la salamandre cendrée : la forme rayée (en haut) et la forme à dos de plomb (en bas). Photo © Martin Ouellet.

0,43 m/jour (Kleeberger & Werner 1982). Toutefois, lorsque des salamandres sont déplacées à 30 m de leur territoire, 90% d'entre elles y retournent rapidement par un trajet rectiligne (Kleeberger & Werner 1982). Bien qu'elle soit retrouvée dans des milieux hautement fragmentés (Gibbs 1998a, c), la salamandre cendrée est sensible aux modifications de l'habitat causées par les lisières forestières et elle est affectée négativement par la présence de routes. En effet, la présence de gravier diminue l'humidité du sol aux abords de la route et cet effet de lisière induit une diminution de l'abondance des salamandres cendrées jusqu'à 20 m dans la forêt (Marsh & Beckman 2004).

## **1.6.2 La salamandre à points bleus**

### **1.6.2.1 Taxonomie**

La salamandre à points bleus (*Ambystoma laterale*, Figure 1.6) fait partie de la famille des Ambystomatidae, également appelées salamandres fouisseuses. Cette famille regroupe les 32 espèces du genre *Ambystoma* retrouvées en Amérique du Nord, du sud du Canada jusqu'au Mexique (AmphibiaWeb 2009). Au Québec, en plus de la salamandre à points bleus, il n'y a qu'une seule autre espèce d'Ambystomatidae, soit la salamandre maculée (*Ambystoma maculatum*). Les Ambystomatidae ont un corps robuste et sont généralement de grande taille, la plus grande espèce (la salamandre tigrée, *Ambystoma tigrinum*) pouvant atteindre 35 cm de long (Petranka 1998). Cette famille regroupe pour la plupart des espèces terrestres. Comme leur nom l'indique, les salamandres fouisseuses s'enfouissent régulièrement dans le sol où elles passent une grande partie de leur temps. On peut parfois les observer à découvert lors de nuits pluvieuses lorsqu'elles sortent pour s'alimenter, ou encore lors des migrations printanières lorsque les adultes rejoignent les étangs de reproduction.



**Figure 1.6** Salamandre à points bleus.

### 1.6.2.2 Écologie

La salamandre à points bleus est une espèce largement répandue dans les forêts du nord-est de l'Amérique du Nord. Son corps est gris foncé ou noir et couvert de mouchetures bleues, d'où son nom. Les adultes mesurent de 7,5 à 13 cm de longueur et les mâles sont généralement plus petits et ont une queue relativement plus longue que le corps comparativement aux femelles (Lowcock et al. 1991, Petranka 1998). La salamandre à points bleus se nourrit de petits invertébrés tels des escargots, coléoptères, et diverses larves d'insectes (Bellocoq et al. 2000). La reproduction a lieu au début du printemps, dans des étangs dépourvus de poissons (Lowcock et al. 1991, Karns 1992). La migration des adultes de la forêt à l'étang de reproduction se fait lors de nuits pluvieuses. Suite à l'amplexus, le mâle dépose des spermatophores au fond l'étang. En nageant au-dessus des spermatophore, elle absorbe le sperme qui fécondera ses œufs. Quelques jours plus tard, les œufs sont pondus en une masse lâche de 2 à 15 œufs attachée à la végétation aquatique et chaque femelle peut ainsi pondre de 80 à 500 œufs chaque. Les larves naissent de 3 à 4 semaines plus tard et se nourrissent de zooplancton et de larves de diptères (Petranka 1998). De 8 à 14 semaines plus tard, les métamorphes quittent l'étang à une taille moyenne de 34 mm museau-cloaque (MC) et atteignent la maturité sexuelle à deux ans, lorsque les salamandres mesurent minimalement 42 et 51 mm MC pour les mâles et les femelles respectivement (Licht 1989).

Bien que la salamandre à points bleus soit relativement abondante dans plusieurs régions de son aire de distribution, elle est néanmoins vulnérable ou menacée dans huit des 14 états américains où on la retrouve (NatureServe 2008). La dégradation et la perte d'habitat causées par la destruction des forêts au profit de l'agriculture ou de l'urbanisation représentent une importante menace pour la salamandre à points bleus. L'acidification des cours d'eau pourrait également mettre en péril sa survie puisqu'elle semble incapable de se reproduire lorsque le pH est moins de 4,5 (Karns 1992).

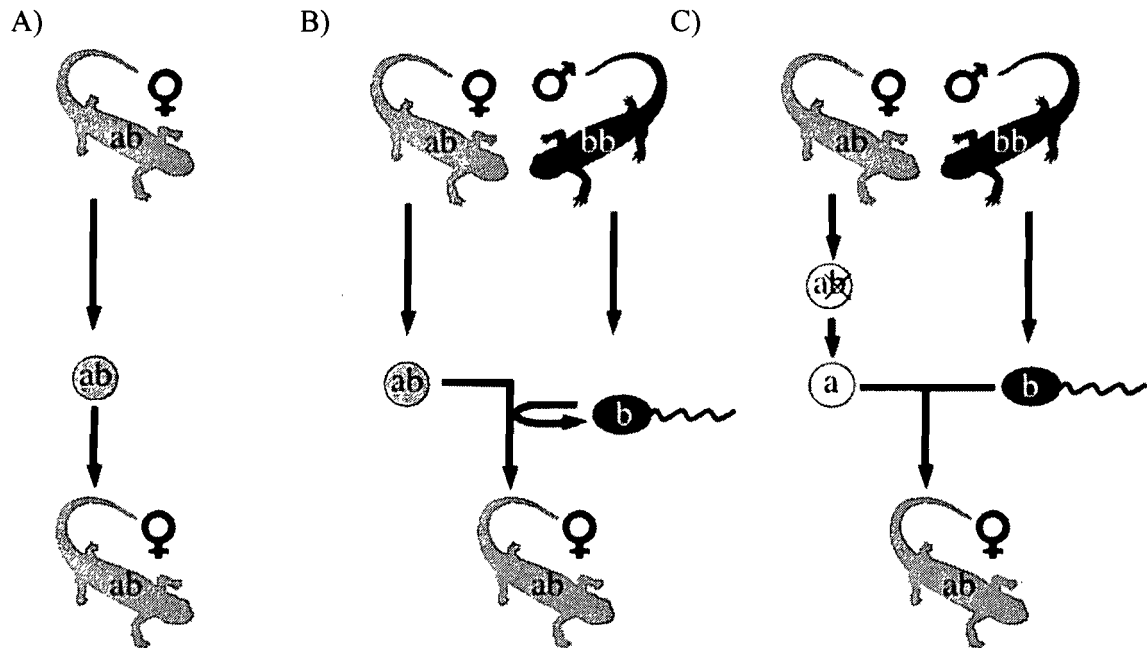


### 1.6.2.3 Vertébrés unisexués

La salamandre à points bleus fait partie du complexe *Ambystoma* qui regroupe quatre espèces bisexuées ainsi que des salamandres unisexuées. Afin de mieux comprendre les particularités de ce complexe unique, il m'apparaît ici pertinent de dresser un portrait sommaire des vertébrés unisexués.

Le premier vertébré unisexué répertorié est un poisson, le molly amazone (*Poecilia formosa*), découvert en 1932 (Hubbs & Hubbs 1932). Environ 80 complexes de vertébrés unisexués appartenant à 14 familles de poissons, amphibiens et reptiles et distribués sur les cinq continents ont été répertoriés (Vrijenhoek et al. 1989, Alves et al. 2001). Tous les unisexués ont en commun les quatre caractéristiques suivantes : 1) ils sont d'origine hybride, 2) ils sont composés exclusivement de femelles ou presque, 3) leurs modes de reproduction (détaillés ci-dessous) empêchent la recombinaison, 4) ils incluent souvent des polyploïdes (Dawley 1989).

Trois modes de reproduction sont observés chez les unisexués, soit la parthénogenèse, la gynogenèse et l'hybridogenèse. La parthénogenèse (Figure 1.7A), le mode le plus simple, consiste en la ponte d'œufs non réduits, c'est-à-dire du même niveau de ploïdie que la mère, et non recombinaison qui sont identiques aux cellules somatiques de la mère. Les œufs se développent en absence de sperme et produisent des jeunes génétiquement identiques à la mère (clones). Parmi les vertébrés unisexués, seuls les reptiles se reproduisent par parthénogenèse et plusieurs espèces de lézards unisexués sont parthénogénétiques (Vrijenhoek et al. 1989). Bien que la parthénogenèse soit connue depuis longtemps chez les insectes, la découverte de ce mode de reproduction chez les vertébrés dans les années 30 a été accueillie avec une certaine incrédulité dans la communauté scientifique, comme en témoigne cette citation du morphologiste américain Howell (1933) :



**Figure 1.7** Modes de reproduction des vertébrés asexués A) Dans la gynogenèse, la femelle unisexuée pond un œuf non réduit qui se développe sans la présence de sperme et la progéniture est identique à la mère (clones). B) Lors de la gynogenèse, le spermatozoïde ne sert qu'à activer le développement de l'œuf. Le matériel génétique du mâle n'est pas incorporé et les jeunes sont également des clones. C) Lors de l'hybridogenèse, l'œuf produit par une femelle diploïde hybride contient uniquement le génome d'une des deux espèces parentales qui est transmis sans recombinaison, alors que le génome de la seconde espèce parentale est évacué. Il y a ensuite fécondation par le sperme et développement de l'œuf. Ce mode de reproduction implique donc la transmission clonale d'un génome, tandis que l'autre génome est acquis par reproduction sexuée.

« *I am sure no vertebrate morphologist would admit for a moment that the natural development from egg to sexual maturity of an individual vertebrate without the direct inclusion of the male element is within the realm of probability* »

La gynogenèse (Figure 1.7B) est semblable à la parthénogenèse, sauf que la présence de sperme est nécessaire pour activer le développement de l'œuf. Bien qu'un spermatozoïde pénètre dans l'œuf (Kobayashi 1971), la fusion des gamètes n'a pas lieu et le matériel génétique mâle n'est pas incorporé. La progéniture issue de la gynogenèse est donc clonale, tout comme dans la parthénogenèse. D'ailleurs, la gynogenèse est parfois considérée comme étant une forme de parthénogenèse, qui se distingue de la parthénogenèse vraie par la nécessité du sperme. Ce mode de reproduction est retrouvé chez plusieurs poissons unisexués (Vrijenhoek et al. 1989).

Dans l'hybridogenèse (Figure 1.7C), l'œuf produit par une femelle diploïde hybride contient uniquement le génome d'une des deux espèces parentales qui est transmis sans recombinaison, alors que le génome de la seconde espèce parentale est évacué. Il y a ensuite fécondation par le sperme et développement de l'œuf. Ce mode de reproduction implique donc la transmission clonale d'un génome, tandis que l'autre génome est acquis par reproduction sexuée. L'exemple classique d'hybridogenèse est donné par les poissons du genre *Poeciliopsis* que l'on retrouve au Mexique. Les espèces bisexuées *Poeciliopsis monacha* et *P. lucida* se reproduisent et forment un hybride nommé *Poeciliopsis monacha-lucida*. Cet hybride produit des œufs haploïdes qui contiennent uniquement le génome de *P. monacha*. Lorsqu'il se reproduit avec des mâles *P. lucida*, un nouvel hybride contenant un génome de chaque espèce est créé. Les grenouilles du complexe *Rana esculenta* se reproduisent également par hybridogénèse (Vrijenhoek et al. 1989).

Ces modes de reproductions particuliers et les individus qui en découlent sont à la source d'une controverse sur la nomenclature à adopter pour nommer les vertébrés unisexués. Doit-on les considérer comme des espèces? Ce débat, qui dépasse le cadre de cette thèse, ne sera pas abordé ici. La nomenclature qui est adoptée dans cette étude correspond à celle utilisée par Schultz (1969) pour décrire les poissons du genre *Poeciliopsis* et dont Lowcock et al. (1987) a suggéré l'application au complexe *Ambystoma*. Cette nomenclature prône l'utilisation de la composition génomique comme unité de désignation. Cette position a été choisie en raison de son utilisation répandue en ce qui a trait au complexe *Ambystoma* (ex. Bogart & Klemens 1997, Ramsden et al. 2006, Bi et al. 2008).

#### 1.6.2.4 Complexe *Ambystoma*

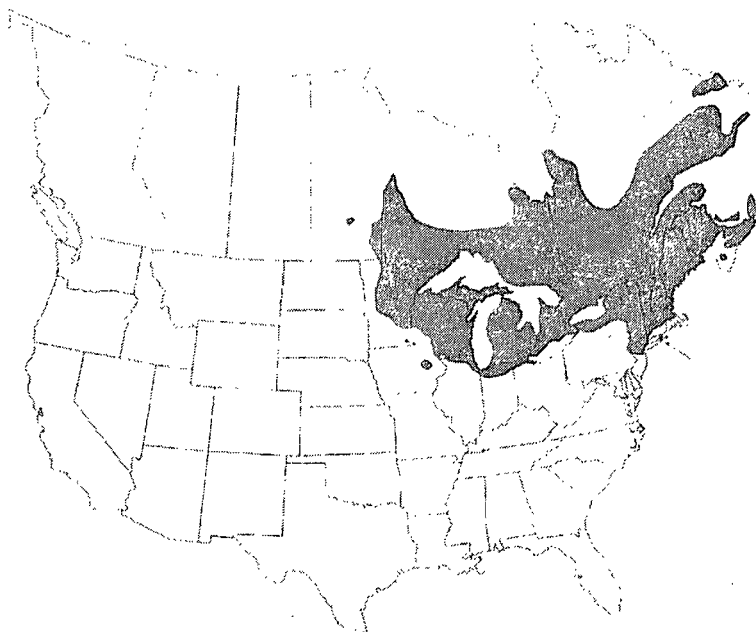
Le complexe *Ambystoma* regroupe quatre espèces bisexuées: la salamandre à points bleus, la salamandre de Jefferson (*Ambystoma jeffersonianum*), la salamandre à nez court (*Ambystoma texanum*), et la salamandre tigrée (*Ambystoma tigrinum*), ainsi que des salamandres unisexuées. Ces salamandres unisexuées sont pratiquement toutes des femelles, les mâles ne représentant que de 0,8 à 1,3% des salamandre unisexuées échantillonnées en Ontario et aux Etats-Unis (Bogart & Klemens 2008). Les unisexuées présentent différents niveaux de ploïdie et intègrent minimalement une copie du génome nucléaire de la salamandre à points bleus et diverses combinaisons du génome nucléaire des trois autres espèces bisexuées. Afin de désigner la composition génomique nucléaire des salamandres du complexe *Ambystoma*, un système informel a été adopté dans lequel chaque lettre identifie un jeu de chromosomes d'une espèce (J = *A. jeffersonianum*, L = *A. laterale*, T = *A. texanum*, et Ti = *A. tigrinum*). À ce jour, 20 combinaisons, également appelées génotypes (Lowcock 1994) ont été répertoriés. On y retrouve des diploïdes (LJ, LT), des triploïdes (LLJ, LJJ, LLT, LTT, LTJ, LJTi, LTTi), des tétraploïdes (LLLJ, LJJJ, LLJJ, LLLT, LTTT, LLTT, LJTi, LTTi, LTTiTi, LTJTi) et un pentaploïde (LLLLJ). Toutes les

salamandres unisexuées, quel que soit leur génotype, partagent un haplotype mitochondrial différent des quatre espèces bisexuées et semblable à celui de *A. barbouri* (Hedges et al. 1992, Bogart 2003, Robertson et al. 2006). On croit ainsi que les salamandres unisexuées seraient issues d'événements ancestraux d'hybridation (25 000– 3 millions d'années) impliquant un ancêtre de *A. barbouri*, une espèce que l'on retrouve uniquement en Indiana, au Kentucky, en Ohio, au Tennessee et en Virginie occidentale (Robertson et al. 2006, Bogart et al. 2007).

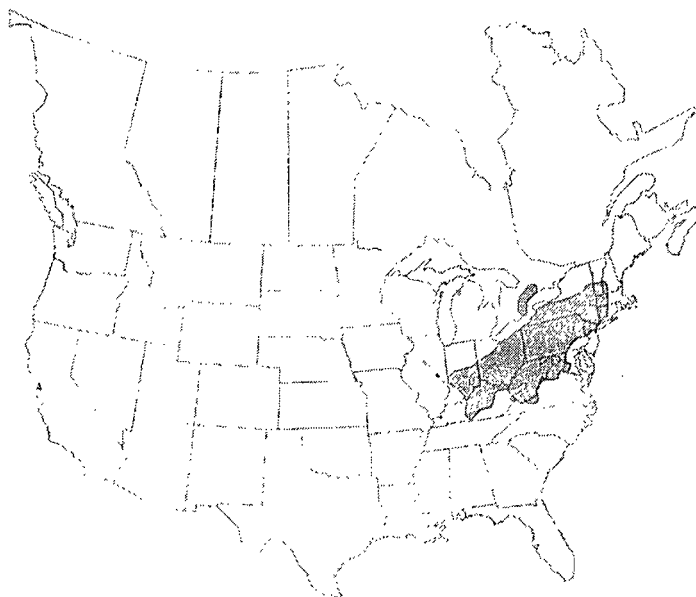
Le mode de reproduction des salamandres unisexuées du complexe *Ambystoma* a longtemps été mystérieux (voir Vrijenhoek et al. 1989). On sait maintenant qu'elles se reproduisent par le biais d'un oeuf non réduit, c'est-à-dire du même niveau de ploïdie que la mère. Lorsque le sperme d'un mâle d'une des quatre espèces bisexuées entre en contact avec l'œuf, trois scénarios sont possibles. Le sperme peut simplement activer le développement de l'œuf (gynogenèse), être incorporé (élévation de ploïdie), ou encore remplacer un jeu de chromosome présent dans l'œuf (remplacement de génome). Ces trois événements font partie intégrante de la reproduction des *Ambystoma* unisexuées et ce mode de reproduction unique a récemment été nommé kleptogenèse du fait que les femelles « volent » le génome des mâles sympatriques (Bogart et al. 2007).

Au sein du complexe *Ambystoma*, on retrouve le complexe de Jefferson qui comprend la salamandre à points bleus, la salamandre de Jefferson et les salamandres unisexuées comprenant diverses combinaisons du génome des deux espèces bisexuées (LJ, LLJ, LJJ, LLLJ, LJJJ, LLJJ, LLLLJ). La salamandre à points bleus et la salamandre de Jefferson se retrouvent toutes les deux dans le nord-est de l'Amérique du Nord, l'aire de distribution de la salamandre de Jefferson étant toutefois plus réduite et plus australe (Figure 1.8). La salamandre de Jefferson est d'ailleurs menacée au Canada, où elle n'est présente que dans de petites populations fragmentées au sud de l'Ontario (COSEWIC 2000). Bien qu'il soit facile de distinguer morphologiquement la salamandre à

(A)



(B)



**Figure 1.8** Aires de distribution de la salamandre à points bleus (A) et de la salamandre de Jefferson (B). Les flèches représentent des populations retrouvées dans des aires discontinues. Illustration tirée de Petranka 1998.

points bleus de la salamandre de Jefferson, on peut difficilement différencier les unisexués des espèces bisexuées puisque les unisexués peuvent ressembler à l'une ou l'autre des espèces parentales ou présenter des caractéristiques intermédiaires. Deux couples de salamandres sont particulièrement semblables : la première paire est composée des triploïdes LLJ et de *A. laterale* (LL), l'autre paire est constituée des triploïdes LJJ et de *A. jeffersonianum* (JJ). Les triploïdes LLJ, autrefois élevés au rang d'espèce sous le nom de salamandre de Tremblay (*A. tremblayi*, Comeau 1943, Uzzell 1964), se retrouvent sporadiquement dans l'aire de distribution de *A. laterale*. De la même manière, les triploïdes LJJ sont dispersés dans l'aire de répartition de *A. jeffersonianum* et ont également déjà été considérés comme une espèce à part entière sous le nom de salamandre argentée (*A. platineum*, Cope 1867, Uzzell 1964).

Afin de discriminer les membres du complexe de Jefferson, diverses méthodes d'identification basées sur les allozymes (Bogart 1982, Bogart et al. 1985), le nombre de chromosomes (Sessions 1982), la taille des érythrocytes (Uzzell 1964, Wilbur 1976, Austin & Bogart 1982), la quantité d'ADN (Lowcock et al. 1991) ou les microsatellites (Julian et al. 2003, Ramsden et al. 2006) ont été développées. Toutefois, toutes ces techniques hormis les microsatellites, nécessitent de tuer l'animal, et plusieurs utilisent des équipements coûteux. L'identification des salamandres du complexe de Jefferson est donc relativement difficile, particulièrement dans un cadre de conservation d'une espèce menacée où l'on ne peut se permettre de sacrifier les individus.

## 1.7 Organisation de la thèse

Tel que vu précédemment, l'objectif général de ce projet est d'évaluer les effets de l'urbanisation sur la structure génétique de deux espèces de salamandres. La thèse est divisée en deux volets, traitant respectivement de la salamandre cendrée et de la salamandre

à points bleus. Chacun de ces volets comprend deux chapitres, qui seront présentés sous formes d'articles scientifiques.

L'objectif du premier chapitre est d'évaluer l'effet de la fragmentation de l'habitat forestier du Mont-Royal sur la salamandre cendrée. Cette colline montréalaise située au cœur de Montréal a une grande histoire de perturbations anthropiques et des populations de salamandre cendrée (*Plethodon cinereus*) persistent dans quelques secteurs de la montagne isolés depuis plusieurs années par des routes, cimetières ou quartiers résidentiels (Ouellet et al. 2004). Des analyses génétiques comparant les populations du Mont-Royal avec celles du Mont-Mégantic, un habitat non fragmenté, seront présentées. L'objectif du deuxième chapitre est d'élargir la problématique abordée lors du premier chapitre et de caractériser génétiquement les populations de la salamandre cendrée situées dans des fragments forestiers sur toute l'étendue de l'île de Montréal. Le deuxième volet de ma thèse, soit les chapitres 4 et 5, traite de la salamandre à points bleus. Dans un premier temps, il était nécessaire de développer une méthode d'identification rapide, simple et peu coûteuse permettant de distinguer la salamandre à points bleus des salamandres unisexuées. Le chapitre 4 présente une technique moléculaire basée sur un PCR en multiplex. Le cinquième chapitre visait à obtenir de l'information sur la répartition des différents génotypes dans les populations du Québec, une région située à la limite nord de l'aire de distribution des salamandres unisexuées et où aucune étude approfondie à ce sujet n'avait été réalisée. De plus, cet aspect de ma thèse vise à répondre à une demande du Service Canadien de la faune qui désire augmenter le niveau de connaissance sur la diversité biologique présente dans certaines aires protégées fédérales au Québec. Pour ce faire, cinq populations ont été examinées à l'aide de marqueurs génétiques, dont une provenant du Mont-Royal et les autres d'aires naturelles préservées. Finalement, le sixième chapitre présente un retour sur les objectifs initiaux et souligne les principaux résultats obtenus, tout en proposant des avenues de recherches futures.



## CHAPITRE 2

### Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander<sup>1</sup>

---

#### 2.1 Résumé

L'urbanisation est une cause importante de perte et de fragmentation d'habitat. Toutefois, peu d'études ont traité de la fragmentation dans un contexte urbain. Dans cet article, nous examinons la structure génétique de populations de la salamandre cendrée (*Plethodon cinereus*) dans une grande ville. Quatre populations ont été échantillonnées sur le Mont-Royal, une montagne située au cœur de Montréal (Québec, Canada) qui présente une mosaïque d'îlots forestiers séparés par des routes, des cimetières et des bâtiments. La structure génétique de ces populations fut évaluée à l'aide de microsatellites et comparée à celle de quatre populations situées dans un habitat forestier continu du sud du Québec. Les résultats indiquent que la richesse allélique et l'hétérozygotie sont plus faibles au sein des populations urbaines. Les tests exacts de différenciation et les valeurs de  $F_{ST}$  montrent également que les populations fragmentées sont génétiquement différentes les unes des autres alors que les populations situées dans un habitat continu sont génétiquement homogènes. Ces résultats sont inquiétants pour la conservation de ces populations, ainsi que pour les espèces rares ou menacées retrouvées dans les centres urbains.

#### 2.2 Abstract

Urban development is a major cause of habitat loss and fragmentation. Few studies, however, have dealt with fragmentation in an urban landscape. In this paper, we examine the genetic structure of isolated populations of the eastern red-backed salamander

---

<sup>1</sup> Noël S, Ouellet M, Galois P, Lapointe FJ (2007) Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conservation Genetics* **8**, 599-606.

(*Plethodon cinereus*) in a metropolitan area. We sampled four populations on the Mount Royal, a mountain located in the heart of Montréal (Québec, Canada), which presents a mosaic of forested patches isolated by roads, graveyards and buildings. We assessed the genetic structure of these populations using microsatellite loci and compared it to the genetic structure of four populations located in a continuous habitat in southern Québec. Our results indicate that allelic richness and heterozygosity are lower in the urban populations. Exact differentiation tests and pairwise  $F_{ST}$  also show that the populations found in the fragmented habitat are genetically differentiated, whereas populations located in the continuous habitat are genetically homogeneous. These results raise conservation concerns for these populations as well as for rare or threatened species inhabiting urban landscapes.

### **2.3 Introduction**

In the past few years, a decline of amphibian populations has been observed worldwide (Houlahan et al. 2000). Although the causes of this decline often remain unknown, numerous factors have been proposed, such as climate changes (Pounds et al. 1999), pollutants (Kucken et al. 1994), ultraviolet radiations (Blaustein et al. 1998), diseases (Berger et al. 1998, but see Ouellet et al. 2005b), acid rain (Beebee et al. 1990), and invasive species (Knapp & Matthews 2000). However, it is habitat modifications including habitat loss, degradation and fragmentation that represent the major factors affecting amphibian diversity (Green 1997, Dodd & Smith 2003).

Many studies have dealt with fragmentation caused by agricultural or logging activities (e.g., Kolozsvary & Swihart 1999, Vos et al. 2001). However, urban development has also been a major factor of landscape evolution and habitat fragmentation (Miller & Hobbs 2002). During the second half of the 20th century, the proportion of the human population living in urban areas has increased steadily, rising from 29% in 1950 to 47% in

2000 (United Nations Population Division 2004). In Canada, more than 78% of the population now live in urban centers (Statistics Canada 2000). As a consequence, urban agglomerations are sprawling at the expense of natural areas within and outside the cities.

Urbanization has a strong negative impact on biodiversity. For example, it has been shown to change species composition and increase the number of invasive species (Tait et al. 2005). Habitat loss due to urbanization is the principal cause of species endangerment in the mainland United States (Czech et al. 2000). To limit the effects of urbanization, parks are often created within metropolitan areas to retain a part of the original biodiversity of the region, and they are thus a very important component of landscapes. However, little is known about animal populations living in urban natural areas, and to what extent they are affected by urban challenges such as human disturbance, pet predation, proliferation of pest species and most importantly, habitat fragmentation.

Habitat fragmentation can be defined as the subdivision of a large area of habitat into smaller isolated patches (Wilcove et al. 1986). It usually implies a diminution in the total amount of habitat available and a change in the spatial configuration of the remaining habitat (Fahrig 2003). Fragmentation is thought to have severe effects on the genetic structure of populations. After fragmentation, the remaining populations are smaller and more susceptible to greater temporal variation in population size, which increase their extinction probabilities (Reed & Hobbs 2004). Following bottlenecks, populations may experience loss of rare alleles and a diminution of heterozygosity through genetic drift and inbreeding. These processes contribute to the erosion of genetic diversity and can lead to fitness reduction (Reed & Frankham 2003). Also, as genetic diversity represents the adaptative potential of a species, reduced genetic variability can inhibit the ability of a population to respond to rapid environmental changes (Young et al. 1996).

Here, we assess the impact of urban fragmentation on the population genetic structure of the eastern red-backed salamander (*Plethodon cinereus*), a small terrestrial amphibian species distributed throughout eastern North America. Two different color morphs are found in most natural populations. The striped morph has a red stripe on the back and the tail, whereas the lead-backed morph is uniformly dark and lacks this stripe. This coloration pattern is controlled by a single gene for which the allele coding for the striped morph is dominant (Highton 1959). Additionally, erythristic morphs, which are entirely red, and albinos are also occasionally encountered in some populations (Reed 1908, Rosen 1971, Dyrkacz 1981). Like all members of the genus *Plethodon*, the eastern red-backed salamander does not have an aquatic larval stage (Petranka 1998). Females lay their eggs under logs, rocks and other natural cover objects and the eggs develop into tiny salamanders resembling the adults. Eastern red-backed salamanders are associated with mature forests with moist soils (Grover 1998, Bonin et al. 1999, Hyde & Simons 2001) and rarely venture across dry and hot habitats (Larson et al. 1984). Dispersal distances of *Plethodon cinereus* are not clearly known. Although the mean daily movements are as low as 0.4 m, it has been shown that some individuals can easily travel 30 m to return to their territory when displaced. However, the homing ability is greatly reduced when displacement distances increase up to 90 m (Kleeberger & Werner 1982). *P. cinereus* usually occurs at high densities (Jaeger 1979) and often represents the most abundant species of salamander in forests (Burton & Likens 1975, Marsh & Beckman 2004). Eastern red-backed salamanders can even be encountered in highly patchy habitats, and thus seem to be resilient to fragmentation (Gibbs 1998a, c). However, the population sizes of isolated populations are probably reduced because small habitats usually harbor smaller populations than larger patches (Fahrig 2003) and because the eastern red-backed salamander is sensitive to edge effect (deMaynadier & Hunter 1998). Consequently, dispersal patterns and genetic diversity may be altered in isolated populations, but it is not clear to what extent habitat fragmentation affects the genetic structure of the eastern red-backed salamander.

In this paper, the effect of habitat fragmentation on the eastern red-backed salamander was evaluated by comparing isolated urban populations with populations located in a continuous habitat. First, we predicted that populations from the fragmented habitat would exhibit lower genetic diversity. Secondly, because all urban salamander populations are isolated by dispersal barriers, we expected to detect a higher level of population differentiation among these populations.

## **2.4 Methods**

### **2.4.1 Sampling**

Sampling was conducted in the summer and fall of 2004 on two mountains. Urban salamander populations were sampled from the Mount Royal (45°30' N, 73°35' W), which is a highly fragmented mountain (233 m high) located in the heart of Montréal (Québec, Canada). It is part of the Monteregian Hills, a series of small mountains formed during the Cretaceous by the intrusion of igneous rock into older sedimentary rock (Adams 1903, Ouellet et al. 2005a). The Mount Royal represents an important reservoir of biodiversity in the urban landscape. Unfortunately, it has been gradually fragmented by human activities since the arrival of the first European settlers over 350 years ago. A road, created around 1700, still divides the Mount Royal in two parts, and was probably the first main anthropogenic feature to fragment the habitat. Between 1852 and 1855, two graveyards were established and have considerably contributed to the deforestation of the mountain in the following years. In 1924, a tramway line was constructed along an east/west axis, and was later transformed into a paved road. Intensive residential and commercial development has also occurred on the mountain throughout the years. This strong urbanization has already led to the extinction of at least four species of amphibians and reptiles on the mountain (M. Ouellet et al. unpublished results). Nowadays, the Mount Royal presents a mosaic of

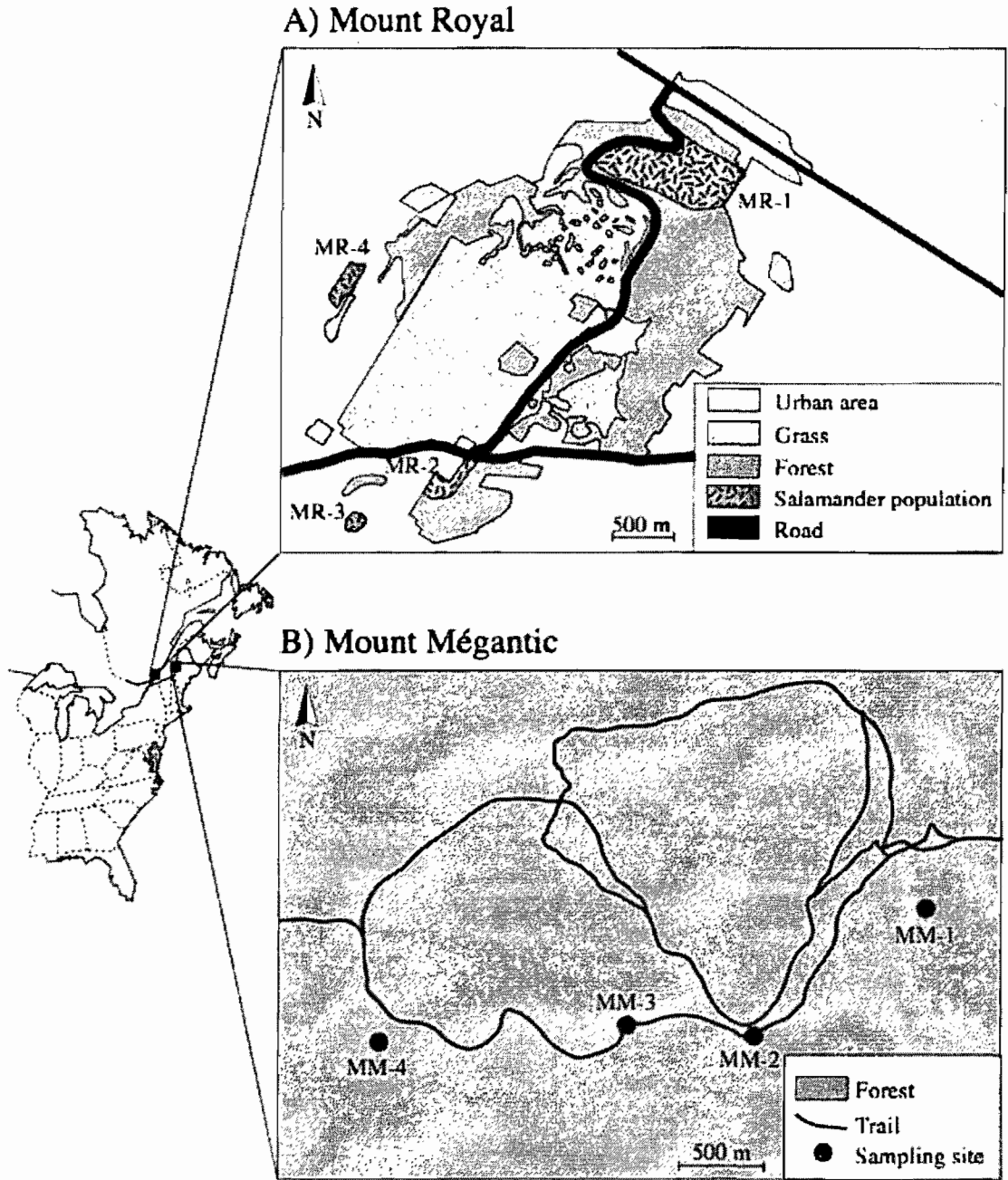
forested habitats, some of them still inhabited by populations of eastern red-backed salamanders. The Mount Royal populations (MR-1 to MR-4) are isolated from each other by roads, graveyards or buildings, and are separated by distances ranging from 0.9 to 3.3 km (Figure 2.1A). In each population, the entire forest patch was searched and the salamander samples thus covered the whole distribution of the species within each habitat.

Salamanders were also collected from the Mount Mégantic (45°27' N, 71°09' W), which lies 190 km east of Montréal, and is the highest (1105 m) and the most pristine of the Monteregian Hills. It is part of a National Park, and it is protected against any form of commercial exploitation or deforestation. The mountain is entirely forested and hence represents a continuous habitat where the distribution of eastern red-backed salamanders is constrained only by altitude. Since we were not able to circumscribe isolated populations in this continuous habitat, we selected four sampling sites (MM-1 to MM-4) distributed in a pattern similar to that of the Mount Royal. Those sampling sites were separated by distances ranging from 0.8 to 4.1 km (Fig. 2.1B).

In each of the eight populations on the two mountains, we collected from 25 to 30 adult specimens by active searches under natural cover objects. Salamanders were captured by hand and tail-tips were cut and stored in 95% ethanol at room temperature until further DNA extraction.

#### **2.4.2 Genotyping**

DNA was extracted using a standard phenol–chloroform protocol (Sambrook et al. 1989) with phase-lock gel (Murphy & Hellwig 1996). We used seven microsatellite loci (PcII14, PcJX06, PcJX24, PcLI16, PcLX16, PcLX23, and PcXF08) designed for *P. cinereus* (Connors & Cabe 2003). All forward primers were fluorescently labeled. Amplifications were carried out in 10 µl volumes including 10 mM Tris–HCl, 0.1% Triton



**Figure 2.1** Map of eastern North America with inserts showing the populations of the eastern red-backed salamander (*Plethodon cinereus*) sampled from the fragmented habitat of the Mount Royal (A) and the continuous habitat of the Mount Mégantic (B).

X-100, 50 mM KCl, 0.3–0.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM of each dNTP, 0.2 μM of each primer, 0.5 U of Taq DNA polymerase, and 50–100 ng of template DNA. PCR conditions were as followed: after initial denaturation at 94°C for 2 min, cycling was performed for 30 cycles of 30 s at 94° C, 45 s at 61°C and 30 s at 72°C, with a final extension of 5 min at 72°C for all loci, except PcII14 for which annealing temperature was 57°C. PCR products were separated on an acrylamide gel using an ABI prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems Inc.). We determined all genotypes using Genescan analysis 3.1.2 (Applied Biosystems Inc.).

### 2.4.3 Analyses

The frequency of red-backed and lead-backed morphs for each population was computed as a mean to evaluate population differentiation with morphological characters. Differences between mountains were assessed with a Fisher exact test. We detected scoring errors and genotyping artifacts such as null alleles, large allele dropout and stutter bands with Micro-checker 2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004). Linkage disequilibrium across all populations and deviation from Hardy–Weinberg equilibrium were tested with Genepop version 3.2 using a Markov Chain method to estimate the exact probability of each test (Raymond & Rousset 1995). We estimated genetic diversity using observed heterozygosity ( $H_O$ ), expected heterozygosity ( $H_E$ ) and allelic richness, a measure of the number of alleles per locus corrected for differences in population size with a resampling procedure (Petit et al. 1998). We also recorded the number of private alleles in each population. All parameters were computed using FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 2002). To test the significance of the differences in  $H_O$ ,  $H_E$ , and allelic richness between Mount Royal and Mount Mégantic populations, we used the non-parametric test implemented in FSTAT with 10,000 permutations. The one-tailed permutation test was used because we expected the populations in the fragmented landscape to have smaller heterozygosity and allelic richness values. Additionally, we computed levels of inbreeding ( $F_{IS}$ ) for each population, and we



obtained 95% confidence intervals by bootstrapping across loci using GDA 1.1 (Lewis & Zaykin 2001).

To examine the population structure within and between mountains, we performed Fisher exact tests of population differentiation across all populations and for all pairwise comparisons in Genepop version 3.2 (Raymond & Rousset 1995). We also assessed population structure by an analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier et al. 1992) and all pairwise  $F_{ST}$  were tested for significance in Arlequin 2.0 (Schneider et al. 2000). To measure dispersal among populations on each mountain, we performed assignment tests (Wasser & Strobeck 1998, Berry et al. 2004) using the Bayesian approach of Rannala & Mountain (1997) implemented in GeneClass2 (Piry et al. 2004). Sequential Bonferroni corrections were applied whenever necessary to correct for multiple comparisons (Rice 1989).

## 2.5 Results

A total of 221 *P. cinereus* were sampled from the two mountains. Striped individuals largely predominated in all populations, with a single lead-backed individual found on Mount Mégantic (99.0% striped) and four on Mount Royal (96.7% striped). The morphotype frequencies were not statistically different on the two mountains ( $P = 0.243$ ).

All loci were polymorphic except PcJX24 for which a single allele was observed. This locus was thus excluded from further analyses. No significant linkage disequilibrium was observed for any pair of loci after correcting for multiple comparisons and all populations were in Hardy–Weinberg equilibrium except MR-1 and MM-1 for the locus PcLX16. Research of genotyping artifacts revealed that this locus is likely to harbor null alleles and it was thus removed from further analyses. The number of alleles per locus ranged from 5 (PcLI16) to 18 (PcII14), with a mean of 12 alleles per locus and a total of 59

different alleles. Number of alleles, number of private alleles, allelic richness, observed heterozygosity ( $H_O$ ) and expected heterozygosity ( $H_E$ ) for each population are given in Table 2.1. One-tailed permutation tests revealed that allelic richness ( $P = 0.0025$ ),  $H_O$  ( $P = 0.0127$ ) and  $H_E$  ( $P = 0.0109$ ) are significantly higher for Mount Mégantic.  $F_{IS}$  ranged from -0.05 to 0.09 but all confidence intervals overlapped zero, indicating no significant inbreeding.

Fisher exact tests of population differentiation revealed a highly significant difference between allelic frequencies of the Mount Royal and Mount Mégantic populations, when all individuals from the same mountain were pooled together ( $P < 0.0001$ ). Within Mount Royal, differentiation was significant for all populations ( $P < 0.001$ ). Moreover, all pairs of population were clearly differentiated on the basis of allelic frequencies (Table 2.2). On the other hand, the populations from Mount Mégantic had similar allelic frequencies ( $P = 0.5733$ ) and no pairwise comparison was significant ( $P$  ranging from 0.1045 to 0.5924).  $F_{ST}$  values were consistent with these results and were only significant for pairwise comparisons among Mount Royal populations (Table 2.2). Probabilities associated with  $F_{ST}$  in Mount Mégantic pairwise comparisons ranged from 0.2351 to 0.9329. A  $F_{ST}$  of 0.2096 was obtained between the two mountains when all individuals from the same mountain were pooled together. The AMOVA revealed that 77.1% of the molecular variance is explained by within-population variation. The partitioning of genetic variation between mountains (18.3%) and among populations within mountains (2.24%) were also significant (Table 2.3). The success rate of assignment ranged from 4% (MM-3) to 80% (MR-4) and was higher for all the Mount Royal populations compared with Mount Mégantic. A total of 58% of individuals were correctly assigned to their population of origin in Mount Royal compared to only 20% for Mount Mégantic. Globally, these results indicate a higher dispersal rate among the continuous habitat of the Mount Mégantic (Table 2.4).

**Table 2.1** Sample sizes (n), number of private alleles and estimates of genetic diversity averaged over all microsatellite loci for the populations of eastern red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*) sampled from a fragmented habitat (Mount Royal) and a continuous habitat (Mount Mégantic).

Populations	n	No. alleles	No. private alleles	Allelic richness	$H_O^a$	$H_E^b$
Mount Royal	120	34	5	3.88	0.41	0.40
MR-1	30	23	1	4.29	0.44	0.42
MR-2	30	24	1	4.51	0.34	0.37
MR-3	30	20	0	3.81	0.57	0.44
MR-4	30	15	1	2.89	0.36	0.36
Mount Mégantic	101	54	25	7.13	0.68	0.75
MM-1	25	37	2	7.23	0.67	0.74
MM-2	26	34	3	6.66	0.68	0.75
MM-3	25	35	2	6.90	0.71	0.74
MM-4	25	39	4	7.75	0.65	0.76

<sup>a</sup>  $H_O$ : Observed heterozygosity

<sup>b</sup>  $H_E$ : Expected heterozygosity

**Table 2.2** Pairwise  $F_{ST}$  values (upper triangular matrix) and probabilities of exact population differentiation tests (lower triangular matrix) for the four eastern red-backed salamander (*Plethodon cinereus*) populations of the Mount Royal. All tests were performed with 10 000 permutations. Significant tests at the 0.05 level are indicated with an asterisk.

	MR-1	MR-2	MR-3	MR-4
MR-1	-	0.0572*	0.0553*	0.0334*
MR-2	0.0009*	-	0.1155*	0.1259*
MR-3	< 0.0001*	< 0.0001*	-	0.0347*
MR-4	0.0002*	< 0.0001*	< 0.0001*	-

**Table 2.3** Analysis of molecular variance (AMOVA) assessing the genetic structure of eastern red-backed salamander (*Plethodon cinereus*) populations from Mount Royal and Mount Mégantic. The probabilities were assessed with 10 000 permutations.

	df	Sum of squares	Variance components	% variation	<i>p</i>
Between mountains	1	83.43	0.36	20.78	0.0292
Among populations within mountains	6	20.72	0.04	2.17	< 0.0001
Within populations	434	586.75	1.35	77.05	< 0.0001
Total	441	845.27	1.75		

**Table 2.4** Results of assignment tests. For each population (rows), the number of individuals assigned to a population (columns) is indicated, along with the success rate (%) of assignment.

	MR-1	MR-2	MR-3	MR-4	MM-1	MM-2	MM-3	MM-4	n total	%
MR-1	12	7	2	9	0	0	0	0	30	40.0
MR-2	6	16	5	2	0	0	0	0	30	53.3
MR-3	3	1	18	8	0	0	1	0	30	60.0
MR-4	4	1	1	24	0	0	0	0	30	80.0
MM-1	1	0	0	0	6	5	5	8	25	24.0
MM-2	0	0	0	0	5	9	9	3	26	34.6
MM-3	0	0	1	0	10	9	1	4	25	4.0
MM-4	0	0	1	0	10	3	7	4	25	16.0

## **2.6 Discussion**

### **2.6.1 Population differentiation**

The comparison of populations sampled from fragmented and continuous landscapes allowed us to clearly assess the impact of habitat fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. Microsatellite analysis indicated a strong population differentiation on the Mount Royal, similar to what has been observed for numerous amphibian populations inhabiting fragmented habitats (e.g., Hitchings & Beebee 1997, Gibbs 1998a, Pabijan et al. 2005). Although the overall assignment success was not very high (58%), it was still important at such a small scale (0.9 to 3.3 km) and as much as 80% of the individuals were correctly assigned to one of the population (MR-4). The population for which the assignment success was the lowest (MR-1, 40%) is found in the largest patch, which may also harbor a larger effective population size that would in turn reduce the effect of genetic drift and subsequent differentiation. The population differentiation observed on the Mount Royal challenges the conception that all populations from formerly glaciated areas are genetically uniform (Highton & Webster 1976). Eastern red-backed salamanders are sedentary animals with home range limited to tens of square meters, which may explain the population differentiation observed (Kleeberger & Werner 1982). However, they have been shown to travel across open fields up to 55 m (Marsh et al. 2004). In this study, populations were separated by non-hospitable habitat by 900 m or more, a distance sufficient to prevent important migration among populations. Moreover, some populations were separated by roads, which are known to have a strong negative effect on animal population through roadkills (Ehman & Cogger 1985, Kuhn 1987, Fahrig et al. 1995, Forman & Alexander 1998). In addition, roads disturb their surrounding habitat through noise and pollutants, which may reduce the densities of the eastern red-backed salamander (Marsh & Beckman 2004).

Unlike microsatellite markers, the analysis of morphotype frequency did not reveal any differences among populations of the Mount Royal. Greer (1973) suggested that the distribution of morph frequency in *P. cinereus* was correlated to climate, with unstriped morphs generally being more prevalent where the climate is warmer (Lotter & Scott 1977). Because all populations were sampled in the northern part of the species distribution, it may explain why striped individuals were largely predominant. However, differences in morph frequencies are known to occur over less than 10 km (Highton 1977), such that other factors should be involved to explain the variation in morph frequency. Although the mechanism is not yet fully understood, several hypotheses have been proposed, such as ecological isolation and differential fitness (e.g., Thurow 1961, Brown 1965, Pfingsten & Walker 1978).

Salamanders from Mount Royal and Mount Mégantic were found to be genetically different and this differentiation may be the result of long term genetic isolation. Alternatively, the high  $F_{ST}$  value observed between these populations suggest that the two mountains may have been colonized by salamanders from different refugia following the Pleistocene glaciation, a similar pattern as that observed for many species in southeastern Canada (Mandrak & Crossman 1992, Bernatchez 1997, Murdoch & Hébert 1997, Noël et al. 2005, Tessier et al. 2005).

### **2.6.2 Genetic diversity**

All molecular estimates of genetic diversity were lower for the fragmented Mount Royal populations. Lower genetic diversity for populations in fragmented habitat has been observed for a variety of amphibian species (e.g., Hitchings & Beebee 1997, 1998, Andersen et al. 2004). However, in a similar study involving eastern red-backed salamander populations isolated for a comparable timescale (200–300 years), Gibbs (1998a) did not find significant differences in the genetic diversity of populations in

fragmented and continuous habitat. In this particular study, genetic diversity was measured using three Random Amplified Polymorphic DNA markers (RAPDs, Welsh & McClelland 1990, Williams et al. 1990). Because RAPDs are dominant markers, it takes more markers to obtain a similar level of resolution with respect to co-dominant markers. This may explain, in part, the similarity in genetic diversity observed by Gibbs (1998a) for salamander populations living in fragmented and unfragmented habitat.

The diminution of genetic diversity may be related to the decrease of population size induced by fragmentation and subsequent genetic drift (Frankham 1996). Although the actual sizes of the Mount Royal populations are unknown, we have many reasons to believe that they are rather small. First, the remaining *P. cinereus* are confined to small patches, which harbor smaller populations than larger patches (Fahrig 2003). Secondly, the Mount Royal is frequented by 3 millions visitors every year for recreational activities, including mountain biking, and these visitors often wander outside established paths, thus perturbing even more the suitable habitat for salamanders (M. Ouellet et al. unpublished results). Finally, eastern red-backed salamanders are sensitive to habitat modifications induced by the proximity of forest edges (Marsh & Beckman 2004).

Based on simulations, the reduction of genetic variability due mainly to genetic drift should be detectable after 10 generations in small populations (Lacy 1987). While the generation time of eastern red-backed salamanders is not clearly known, it is generally assumed to be from 5 to 10 years (Gibbs 1998a). The first instance of fragmentation on the Mount Royal was the construction of a road separating populations MR-2 and MR-3 from the others in 1700. Although it was at first only a small country road, it was probably enough to somewhat reduce gene flow. Nowadays, this road is a major avenue that acts as a strong barrier to salamander migration. Using these figures, it appears that the eastern red-backed salamander populations may have been fragmented for at least 30 generations, a sufficient amount of time to observe the effects of genetic drift.



Alternatively, the lower genetic diversity observed in the Mount Royal populations may not be caused by habitat fragmentation, but rather be the result of a founder effect. Because Mount Royal is located on an island, it is very likely that fewer individuals have colonized this mountain after the retreat of glaciers, leading to such a small genetic diversity.

The low genetic diversity is worrying for the urban populations of the eastern red-backed salamander. Because genetic diversity is highly correlated with fitness, and because low genetic diversity reduces the ability of a species to adapt to changing environments, the long term survival of these populations may be at risk (Young et al. 1996, Reed & Frankham 2003). Moreover, the populations are facing other important threats such as habitat loss caused by residential and commercial development projects and habitat degradation caused by recreational activities.

The eastern red-backed salamander is a widely distributed species encountered almost in every mature forest, and which could reach impressive densities (Jaeger 1979). Yet, our results show that this common species may be severely affected by habitat fragmentation, and this raises concern for rare or threatened species inhabiting such urban landscapes.

## **2.7 Acknowledgements**

We would like to thank D. Fournier, P. Graillon, S. Marquis, M.-J. Morin, R. Pétel, É. Richard and N. Tessier for their contribution to this study and all members of the Laboratoire d'Écologie Moléculaire et Évolution for their comments on an earlier draft of this manuscript. This study was supported by the Direction des sports, des parcs et des espaces verts de la Ville de Montréal, the Parc national du Mont- Mégantic, Amphibia-Nature, a NSERC scholarship to S. Noël and NSERC grant no. 0155251 to F.-J. Lapointe.

Our sampling protocol was approved by the Comité de déontologie de l'expérimentation des animaux of the Université de Montréal (CDEA 05-023).

## CHAPITRE 3

### Conservation genetics of a terrestrial salamander (*Plethodon cinereus*) in an urban landscape<sup>1</sup>

---

#### 3.1 Résumé

L'urbanisation est un processus observé mondialement et qui a de nombreux effets négatifs sur les écosystèmes. Par exemple, il s'agit d'une source importante de perte d'habitat, et les espèces animales qui habitent les villes présentent souvent des populations très fragmentées. Ces mêmes populations peuvent être sujettes à des problèmes liés à la réduction de l'abondance et à l'isolement, tels que la dérive génique et la consanguinité. Dans cet article, nous avons évalué la structure génétique de populations urbaines de salamandres cendrées situées dans des îlots forestiers au cœur d'une grande ville (Montréal), ainsi que sur deux îles adjacentes. Les analyses microsatellites ont révélé une forte différenciation génétique entre les populations de Montréal et celles des îles voisines. Au sein de Montréal, il ne semble pas y avoir de structure, certaines populations distantes de plus de 35 km n'étant pas différenciées. Toutefois, trois populations situées près du centre-ville dans une région où les perturbations anthropiques sont plus anciennes sont clairement différenciées les unes des autres. Ces populations ont probablement des tailles efficaces très réduites depuis de nombreuses années ce qui favorise la dérive génique et la différenciation. Bien que la consanguinité n'ait été détectée dans aucune population, la diversité génétique est relativement faible. Ces résultats illustrent l'importance de préserver

---

<sup>1</sup> Noël S, Lapointe FJ. Conservation genetics of a terrestrial salamander (*Plethodon cinereus*) in an urban landscape. Sera bientôt soumis pour publication à *Journal of Wildlife Management*.

les zones forestières dans les grandes villes, en particulier lorsque que ces îlots peuvent également abriter des espèces plus rares et menacées qui pourraient être encore plus affectées par l'urbanisation.

### **3.2 Abstract**

Urbanization is a global process that negatively affects ecosystems in various ways. It is namely an important cause of habitat loss, and animal species inhabiting cities often exhibit highly fragmented populations. Those populations may be prone to problems associated with reduced abundance and isolation such as genetic drift and inbreeding. In this paper, we assessed the genetic structure of urban red-backed salamander populations located in remnant forested areas within a major city (Montréal) and on two nearby islands. Microsatellite analysis revealed a high degree of genetic differentiation among populations from Montréal and from neighboring islands. Within Montréal island, no clear genetic structure was detected, with some populations as far as 35 km apart not being differentiated. On the other hand, genetic differentiation was observed at a small spatial scale (0.7 to 1.7 km) for three populations located near downtown area where anthropogenic perturbations are older. We believe these populations had very low effective population size for a long time, allowing for fast genetic drift and subsequent population differentiation. Although no inbreeding was detected in any population, genetic variation was relatively low. These results illustrate the importance of preserving large forested areas within cities, especially given that these patches may also harbor rarer and threatened species which may be even more negatively affected by urbanization.

### 3.3 Introduction

As human population is steadily growing, the development of rural and natural lands into urban areas is observed worldwide. Urbanization is caused by the augmentation of city dwellers at a global scale. In 2008, more than half of the world population was living in urban settings and this number is expected to rise to almost 5 billion people in 2030 (UNFPA 2007). Although the rate of urbanization is particularly important in the developing countries, it is still in the developed countries that the proportion of population living in urban areas (73.9%) is the highest (Cohen 2006). In Canada, more than 80% of the population lives in urban centers, and this number is expected to reach 87% in 2030 (UNCDB 2005).

Urbanization negatively affects ecosystems through various processes. For example, it alters the climate (Hua et al. 2008, Lin et al. 2008, Trusilova et al. 2008), pollutes air and water (Molina & Molina 2004, Onodera et al. 2008) and modifies soil chemical properties (Pouyat et al. 2008). It is known to modify species assemblages (Slawski et al. 2008, Vallet et al. 2008), promote the introduction of alien species and biotic homogenization (Tait et al. 2005, McKinney 2002, 2006) and reduce species richness (Paul & Meyer 2001). It is also an important cause of land fragmentation (Irwin & Bockstael 2007), and habitat loss caused by urbanization is the leading source of species endangerment in the mainland USA, as it is responsible for the decline of more than half of the species listed as threatened or endangered under the U.S. Endangered Species Act (Czech et al. 2000).

Although conservation actions are much easier to implement in pristine areas located outside densely populated regions, the geographical distribution of biological diversity requires that conservation initiatives also take place within and around urban centers. Indeed, more than 140 cities, including 62 with more than one million inhabitants, are positioned in or directly adjacent to one of the world's 25 biodiversity hotspots (Cincotta & Engelman 2000, Myers et al. 2000). The preservation of green spaces within

cities usually mitigate the negative effects of urban development. In addition to improving the quality of life of city dwellers (Chiesura 2004), these parks function as refuges for the urban fauna and flora (Fernandez-Juricic 2001). Often they represent the only hospitable habitats within the urban matrix and thus, many animal species inhabiting cities exhibit highly fragmented populations. Such populations may be prone to problems associated with reduced abundance and isolation such as genetic drift and inbreeding, both processes contributing to the erosion of genetic diversity and fitness reduction (Reed & Frankham 2003). However, few studies have dealt with animal populations living in cities (e.g. Wandeler et al. 2003, Takami et al. 2004, Field et al. 2007, Vandergast et al. 2007). Conservation studies located in urban landscapes are thus seriously needed to improve our ability to make relevant recommendations on ways to alleviate the negative impacts of urban development on native species (Miller & Hobbs 2002).

Amphibians are believed to be good indicators of the global environmental health (Hermy & Cornelis 2000, Collins & Storfer 2003). Indeed, their high position in the food chain, their high biomass, their complex life histories and their permeable skin are all characteristics that make them both sensitive to environmental changes and easy to sample, two criteria important for indicator taxa (Noss 1990). Among amphibians, the red-backed salamander (*Plethodon cinereus*) is one of the most common indicator species (e.g. Frisbie & Wyman 1995, Welsh & Droege 2001, Venier et al. 2007, Bazar et al. 2008). This small terrestrial amphibian species is distributed throughout eastern North America and presents two different color phases in most natural populations. The striped morphotype has a red stripe on the back and the tail, whereas the unstriped morph, also called lead-backed, is uniformly dark (Pfungsten & Walker 1978). Like other members of the Plethodontini tribe, direct development of the eggs makes this salamander species completely terrestrial, thereby eliminating the need of an aquatic habitat for reproduction (Petranka, 1998). Females lay eggs under logs, rocks and other natural cover objects, where they develop into tiny salamanders resembling adults. Eastern red-backed salamanders are found in mature

forests with moist soils (Grover 1998, Hyde & Simons 2001) and they rarely venture across dry and hot habitats (Larson et al. 1984), except for young adults that may disperse through open fields up to 25 m to colonize new habitats (Marsh et al. 2004). Mark-recapture studies showed that this sedentary species with no sex-biased dispersal (Cabe et al. 2007) has a small home range (10-25 m<sup>2</sup>) but can home successfully in a few days if displaced up to 90 m within the forest (Kleeberger & Werner 1982). The red-backed salamander usually occurs at high densities (Jaeger 1979), often representing the most abundant species of salamander in forests within their distribution range (Burton & Likens 1975, Marsh & Beckman 2004). The species can be encountered in patchy habitats (Gibbs 1998c), which makes it a perfect model to study in highly fragmented landscapes such as a city.

The objective of this study was to assess the effects of urbanization on the genetic structure of red-backed salamander populations located in remnant forested areas within Montréal city. We collected genetic samples of *P. cinereus* from isolated woodlots of various sizes and genotyped them with six microsatellites. Population structure was assessed with a variety of methods, and measures of genetic diversity were tested for relationships with explanatory variables such as patch size, number of visitors and length of trails. We predicted that (1) populations separated by natural barriers such as rivers would be more distinct than populations separated by the urban matrix only, that (2) most populations would be differentiated because of hampered dispersal within the city, and that (3) smaller population would show lower genetic variability and higher population differentiation because of drift and inbreeding.

## **3.4 Methods**

### **3.4.1 Study area**

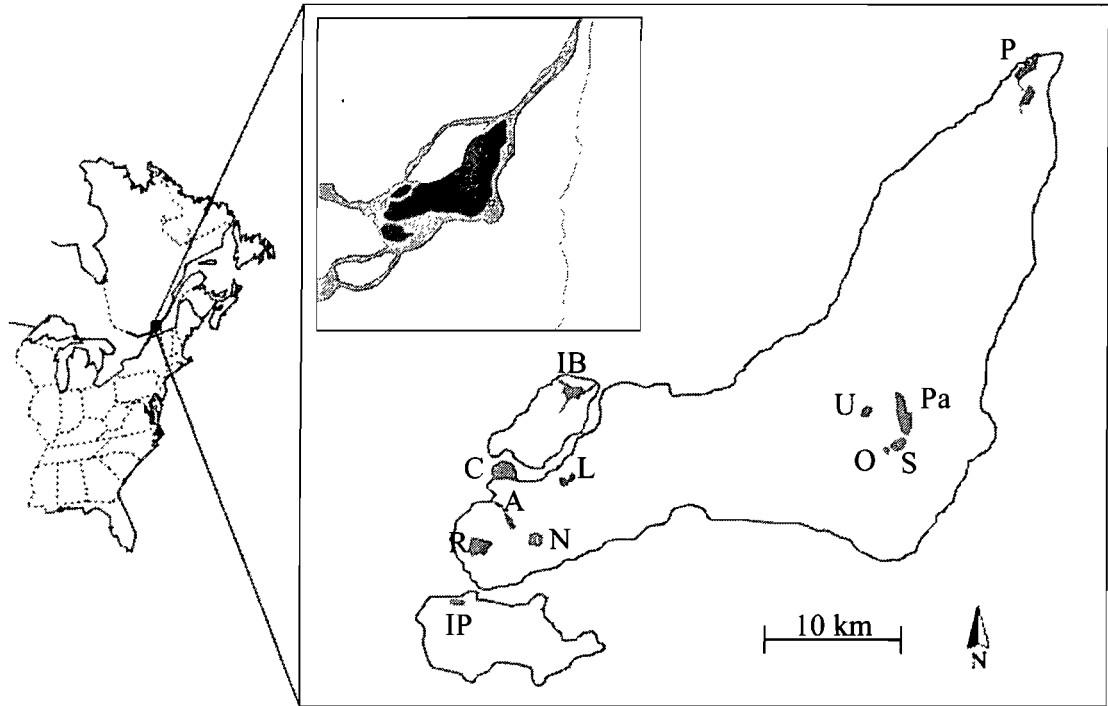
Montréal island is the main island of an archipelago on the St. Lawrence River (Figure 3.1). The city was founded in 1642 and developed rapidly during the following centuries. It is now a bursting city, spread throughout the island and inhabited by more than a million residents (Statistics Canada 2008). With only 1.92 ha of park space per 1000 people, Montréal city ranks penultimate among 14 Canadian cities for green space ratio (Lindsay 2004). Forested areas cover only 0.8% of the island, and the present rate of deforestation is worrying (Cavayas & Beaudoin 2008).

Sampling was conducted in mature forests patches where red-backed salamanders were known to occur. Individuals were collected in several types of habitats, namely urban parks, research reserves, small woodlots and nature parks, which are large parks (34-261 ha) open to the public and harboring preserved wooded land, fields, marshes and beaches.

### **3.4.2 Sampling**

We collected adult red-backed salamanders from 12 forest patches within the urban matrix by turning natural cover objects (Figure 3.1). A total of 10 populations are located on Montréal island, some of them (Oratoire, Parc, Summit and Université) are close to downtown and have been affected by human perturbation since the 18<sup>th</sup> century, while others are found in areas that developed more recently. Two additional populations located on nearby islands (Ile-Bizard and Ile-Perrot) were also sampled. Distances between sampling sites ranged from 0.69 km to 47.3 km, with a mean distance of 18.3 km, and sizes of forested sampling sites varied from 0.5 ha to 13.3 ha (Table 3.1). We cut approximately 1 cm from the tail and we released salamanders where they were captured. We stored tail-tips in 95% ethanol at room temperature until further DNA extraction. We collected all





**Figure 3.1** Map of eastern North America with insert showing the Montréal archipelago on the St-Lawrence River (sampled islands indicated in black) and the location of the 12 red-backed salamander populations analyzed in this study (A: Anse-à-l'Orme, C: Cap-St-Jacques, IB: Ile-Bizard, IP: Ile-Perrot, L: Bois-de-Liesse, N: Angell Woods, O: Oratoire, P: Pointe-aux-Prairies, Pa: Parc, R: Arboretum, S: Summit, U: Université).

**Table 3.1** Coordinates, status, park size, habitat size, km of trails and number of visitors annually for interval for 10 populations of red-backed salamanders sampled from the Montréal island and from Ile-Bizard and Ile-Perrot.

Population	Coordinates	Status	Park size (ha)	Habitat size (ha)	Trails (km)	Nb. visitors per year
<b>Montréal island</b>						
Anse-à-l'orme (A)	45.4405 N, 73.9087 W	Nature park	201	2.8	0.5	15 000
Cap-St-Jacques (C)	45.4670 N, 73.9328 W	Nature park	261	3.8	60	420 400
Bois-de-Liesse (L)	45.4964 N, 73.7691 W	Nature park	159	7.7	43	178 000
Angell Woods (N)	45.4314 N, 73.8945 W	Urban park	75	6.4	4.2	15 000*
Pointe-aux-prairies (P)	45.6693 N, 73.5166 W	Nature park	261	5.9	63	175 000
Arboretum (R)	45.4344 N, 73.9485 W	Reserve	245	9.0	25	40 000
Parc (Pa)	45.5118 N, 73.5883 W	Urban park	115	13.3	80	3 400 000
Université (U)	45.5054 N, 73.6162 W	Woodlot	3	1.4	0	100*
Summit (S)	45.4939 N, 73.6092 W	Urban park	19	3.3	1.1	30 000*
Oratoire (O)	45.4906 N, 73.6167 W	Woodlot	5	0.5	0	100*
<b>Ile-Bizard (IB)</b>	45.5110 N, 73.8758 W	Nature park	201	10	43	50 000
<b>Ile-Perrot (IP)</b>	45.3936 N, 73.9780 W	Research reserve	81	8.4	1.2	600

\* Estimated

individuals in the fall of 2005 and 2006, except those from four populations (Parc, Université, Summit, Oratoire), which were previously collected and genotyped in 2004 (see Noël et al. 2007).

### 3.4.3 Molecular analyses

We extracted DNA using either a standard phenol-chloroform protocol (Sambrook et al. 1989) with phase-lock gel (Murphy & Hellwig 1996) or chelex (Estoup et al. 1996). We genotyped all samples at six dinucleotide microsatellite loci (PcII14, PcJX06, PcI16, PcLX16, PcLX23, PcXF08) designed for *P. cinereus* (Connors & Cabe 2003) using fluorescently labeled forward primers.

We carried out amplifications in 10 µl volumes including 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton x-100, 50 mM KCl, 0.3 to 0.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM of each dNTP, 0.2 µM of each primer, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase, and 50 to 100 ng of template DNA. PCR conditions were as followed: after initial denaturation at 94°C for 2 min, cycling was performed for 30 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 61°C and 30 s at 72°C, with a final extension of 5 min at 72°C for all loci, except PcII14 for which annealing temperature was 57°C. We separated PCR products on an acrylamide gel using an ABI prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems Inc.). We determined all genotypes using Genescan analysis 3.1.2 (Applied Biosystems Inc.).

To understand the mechanisms of population differentiation and the repartition of genetic diversity in the urban landscape, we first conducted analyses on the ten populations from the Montréal island only. The two additional sampling sites located on nearby islands were then included where appropriate to further explore the effects of fragmentation caused by insularization.

We recorded the frequency of striped and lead-backed morphotypes for each population. We tested for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium with Genepop version 3.2 (Raymond & Rousset 1995). We detected scoring errors and genotyping artifacts such as null alleles, large allele dropout and stutter bands with Micro-checker 2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004). We computed parameters of within population genetic diversity such as observed ( $H_O$ ) and expected heterozygosity ( $H_E$ ), number of private alleles ( $p$ ) and mean number of alleles per locus ( $k$ ) using the software GDA 1.1 (Lewis & Zaykin 2001). We used FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2002) to calculate allelic richness ( $A$ ), a measure of the number of alleles per locus corrected for differences in population size with a resampling procedure (Petit et al. 1998). We also computed levels of inbreeding ( $F_{IS}$ ) for each population, and we obtained 95% confidence intervals by bootstrapping across loci using GDA 1.1. We used the heterozygote excess test implemented in Bottleneck 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996) to detect declines in effective population size using the Wilcoxon-signed rank test assuming first a two-phase model (TPM, Di Rienzo et al. 1994) and then the infinite allele model (IAM, Kimura & Crow 1964).

We used various approaches to examine population structure. We performed Fisher exact tests among all pairs of populations and across all loci with Genepop (Raymond & Rousset 1995). We also computed pairwise  $F_{ST}$  and tested for significance as a means to assess population differentiation in Arlequin 2.0 (Schneider et al. 2000). Sequential Bonferroni corrections were applied whenever needed to correct for multiple comparisons (Rice 1989). We constructed a neighbor-joining tree (Saitou & Nei 1987) based on chord distances (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) calculated in MSA 4.05 (Dieringer & Schlötterer 2003) to illustrate relationships among populations. We estimated the tree and associated bootstrap values based on 200 replicates with the Phylip 3.5 package (Felsenstein 1993).

We also used the clustering method implemented in Structure 2.2 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003) to evaluate the number of distinct genetic groups ( $k$ ) of populations. For each hypothesis ( $k=1$  to  $k=10$  or  $k=12$  when islands were included), we computed 10 iterations with a burn-in of 100 000 and 1 000 000 000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) replicates. We determined the most likely solution by the mean likelihood. We performed assignment tests using the Bayesian approach of Rannala & Mountain (1997) implemented in GeneClass2 (Piry et al. 2004). We performed the test twice, first by considering only the 10 populations from Montréal island, and then by including the populations from nearby islands (IB and IP) and by merging all populations from the Montréal island. We assessed isolation by distance among populations by a Mantel test relating genetic differentiation ( $F_{ST}/1-F_{ST}$ ) to log transformed geographic distances using Genepop 3.2. Additionally, we computed a multiple regression on distance matrices including the 12 populations with the software Permute! (Legendre et al. 1994) to evaluate the relative contribution of geographical distances and bodies of water to the genetic structure of red-backed salamanders. The dependent variable was the matrix of  $F_{ST}$  distances. This matrix was compared to two matrices considered as independent variables. The first one represented the geographical distances among populations, while the second was constructed by assigning the value 1 to populations located on different islands and the value 0 to populations located on the same island. To account for possible collinearity between independent variables, we used a backward elimination procedure ( $p$ -to-remove: 0.05) to include only the variables that make a significant contribution to the model (Legendre et al. 1994). Coefficients of the model ( $b$ ,  $R^2$ ) were tested with 1000 permutations, in the same manner as the Mantel test (Mantel 1967).

In order to detect genetic breaks within the urban landscape, we used the Monmonier's maximum difference algorithm (1973) implemented in the software Barrier 2.2 (Manni et al. 2004). This method identifies areas of sharp changes based on a genetic distance matrix, here we used the matrix of chord distances. We computed five barriers and

evaluated their robustness by 100 bootstrap replicates of the distance matrix. We then considered only barriers with more than 75% support.

Finally, we used multiple regressions performed in *Permute!* with a backward elimination procedure (p-to-remove: 0.05) to test for relationships between different measures of genetic diversity ( $H_O$ ,  $H_E$ ,  $A$ ,  $F_{IS}$ ) and explanatory variables such as park size, habitat size (measured by the smallest polygon that encompass all salamanders sampled from each population), number of visitors per hectare and length of trails per hectare.

### 3.5 Results

A total of 416 salamanders were collected from the 12 populations. Striped individuals were the most common color phase sampled in all populations (Table 3.2) and chi-square tests revealed that it was significantly predominant in all populations except Ile-Bizard ( $\chi^2 = 3.571$ ,  $P = 0.059$ ) and Ile-Perrot ( $\chi^2 = 2.314$ ,  $P = 0.128$ ).

No significant linkage disequilibrium was observed for any pair of loci, after applying a Bonferroni correction. All loci within each population were in Hardy-Weinberg equilibrium, except locus PcLX16, which exhibited disequilibrium in three populations (Anse-à-l'orme, Arboretum and Parc). Research of genotyping artifacts revealed that this locus is likely to harbor null alleles, and it was thus removed from further analyses. No other artifacts were detected in any other loci. For the five remaining microsatellites markers, the number of alleles per locus ranged from 6 (PcLI16) to 14 (PcLI14) and a total of 52 alleles were observed across all loci.

**Table 3.2** Sample size (n), frequency of the lead-backed morph, mean number of alleles per locus (k), number of private alleles (p), allelic richness (A), observed ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_E$ ) and coefficient of inbreeding ( $F_{IS}$ ) with 95% confidence interval for 10 populations of red-backed salamanders sampled from the Montréal island and from Ile-Bizard and Ile-Perrot.

Population	n	Lead-backed	k	p	A	$H_o$	$H_E$	$F_{IS}$ (95% CI)
<b>Montréal island</b>								
Anse-à-l'orme (A)	29	0%	4.8	2	4.70	0.428	0.438	0.025 (-0.040 – 0.113)
Cap-St-Jacques (C)	45	24%	5.4	1	4.60	0.418	0.430	0.028 (-0.066 – 0.129)
Bois-de-Liesse (L)	29	14%	4.8	2	4.72	0.455	0.444	-0.025 (-0.134 – 0.147)
Angell Woods (N)	48	6%	4.4	1	3.77	0.384	0.412	0.068 (-0.020 – 0.168)
Pointe-aux-prairies (P)	40	20%	4.6	0	4.12	0.414	0.414	0.002 (-0.057 – 0.112)
Arboretum (R)	48	2%	6.2	2	5.06	0.452	0.470	0.038 (-0.075 – 0.125)
Parc (Pa)	30	7%	4.6	0	4.50	0.440	0.418	-0.053 (-0.197 – 0.153)
Université (U)	30	0%	3.0	0	2.96	0.360	0.367	0.019 (-0.212 – 0.187)
Summit (S)	30	7%	4.8	0	4.70	0.343	0.372	0.080 (-0.009 – 0.167)
Oratoire (O)	30	0%	4.0	0	3.93	0.458	0.436	-0.053 (-0.208 – 0.090)
<b>Ile-Bizard (IB)</b>	28	33%	3.8	0	3.75	0.347	0.404	0.146 (-0.007 – 0.290)
<b>Ile-Perrot (IP)</b>	29	37%	5.6	3	5.57	0.510	0.520	0.021 (-0.080 – 0.097)

### 3.5.1 Montréal island

Within each population on the Montréal island, the total number of alleles varied from 15 (Université) to 31 (Arboretum), with a mean of 23.3. The observed ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranged from 0.343 to 0.458 (mean 0.415) and 0.367 to 0.470 (mean 0.421), respectively (Table 3.2). Allelic richness ranged from 2.96 (Université) to 5.06 (Pointe-aux-Prairies). Inbreeding coefficients varied from -0.05 to 0.08, but confidence intervals overlapped zero for all populations. Bottlenecks were not identified in any population, neither with IAM nor with TPM.

Fisher exact tests revealed that most populations are differentiated, with 29 significant pairwise comparisons out of 45.  $F_{ST}$  values ranged from 0 to 0.132 and were consistent with the results of Fisher exact tests (Table 3.3). The neighbor-joining tree derived from chord distances was poorly resolved, and only one group had a bootstrap value over 50% (Parc and Bois-de-Liesse, bootstrap value of 66%, result not shown). A similar result was obtained with the clustering algorithm implemented in Structure as the distribution of log likelihood from  $k=1$  to  $k=10$  suggested an optimal solution at  $k=1$ . The success rate of assignment for the 10 populations from Montréal ranged from 6.7% to 63.3%, and overall 26.5% of the individuals could be classified in their population of origin (Table 3.4A). Although most populations had a low assignment success (under 30%), three populations had a success over 40% (Université, Summit and Oratoire).  $F_{ST}$  values were not correlated to geographical distances and could thus not be explained by isolation by distance ( $r = 0.025$ ,  $P = 0.69$ ). The first genetic break identified by the software Barrier isolates the population Oratoire. Further barriers isolate the populations Université and Summit. Finally, genetic diversity indices (allelic richness,  $H_o$ ,  $H_e$  and  $F_{IS}$ ) could not be explained by any independent variable in multiple regression analysis.



**Table 3.3** Pairwise  $F_{ST}$  values (below the diagonal) and associated significance probability estimates based on 10 000 permutations (above the diagonal). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$

	A	C	L	N	P	R	Pa	U	S	O	IB	IP
<b>Montréal island</b>												
Anse-à-l'orme (A)		NS	**	*	NS	NS	NS	***	***	***	***	***
Cap-St-Jacques (C)	0.024		NS	**	NS	NS	NS	***	**	***	***	***
Bois-de-Liesse (L)	0.053	0.020		NS	NS	***	NS	**	***	***	***	***
Angell Woods (N)	0.039	0.037	0.028		*	*	NS	***	***	***	***	***
Pointe-aux-prairies (P)	0.021	0.000	0.003	0.032		NS	NS	***	**	***	***	***
Arboretum (R)	0.011	0.008	0.045	0.044	0.013		NS	***	***	***	***	***
Parc (Pa)	0.024	0.000	0.002	0.010	0.000	0.014		*	*	***	***	***
Université (U)	0.131	0.073	0.044	0.083	0.059	0.100	0.033		***	*	***	***
Summit (S)	0.102	0.038	0.051	0.091	0.040	0.050	0.057	0.126		***	***	***
Oratoire (O)	0.132	0.085	0.071	0.073	0.081	0.094	0.055	0.034	0.115		***	***
<b>Ile-Bizard (IB)</b>	0.357	0.372	0.390	0.336	0.387	0.329	0.360	0.444	0.434	0.421		***
<b>Ile-Perrot (IP)</b>	0.180	0.214	0.233	0.177	0.231	0.167	0.198	0.287	0.272	0.256	0.092	

**Table 3.4** Results of assignment tests. For each population (rows), the number of individuals assigned to a population (columns) is indicated, along with the success rate (%) of assignment. Two models are shown: A) the ten populations from Montréal island, B) populations grouped by islands.

A)

	A	C	L	N	P	R	Pa	U	S	O	n total	%
Anse-à-l'orme (A)	6	3	0	5	5	3	1	1	4	1	29	20.7
Cap-St-Jacques (C)	7	4	3	4	6	5	2	7	5	2	45	8.9
Bois-de-Liesse (L)	3	4	8	1	1	0	0	7	4	1	29	27.6
Angell Woods (N)	6	3	2	11	3	7	1	8	2	5	48	22.9
Pointe-aux-prairies (P)	2	5	3	5	3	5	1	9	7	0	40	7.5
Arboretum (R)	6	3	0	6	3	13	3	4	6	4	48	27.1
Parc (Pa)	1	4	2	5	2	5	2	5	3	1	30	6.7
Université (U)	2	2	1	3	1	1	0	19	1	0	30	63.3
Summit (S)	0	4	1	1	1	3	1	2	13	4	30	43.3
Oratoire (O)	0	1	1	2	0	2	0	8	0	16	30	53.3

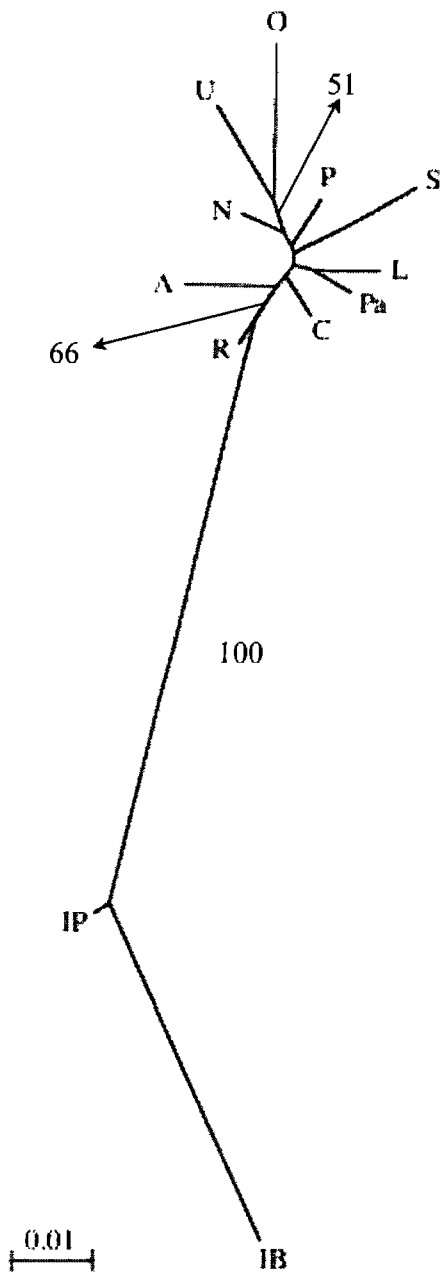
B)

Populations	Mtl	IB	IP	n total	%
Montréal island (Mtl)	353	1	5	359	98.3
Ile-Bizard (IB)	0	25	3	28	89.3
Ile-Perrot (IP)	2	7	20	29	69.0

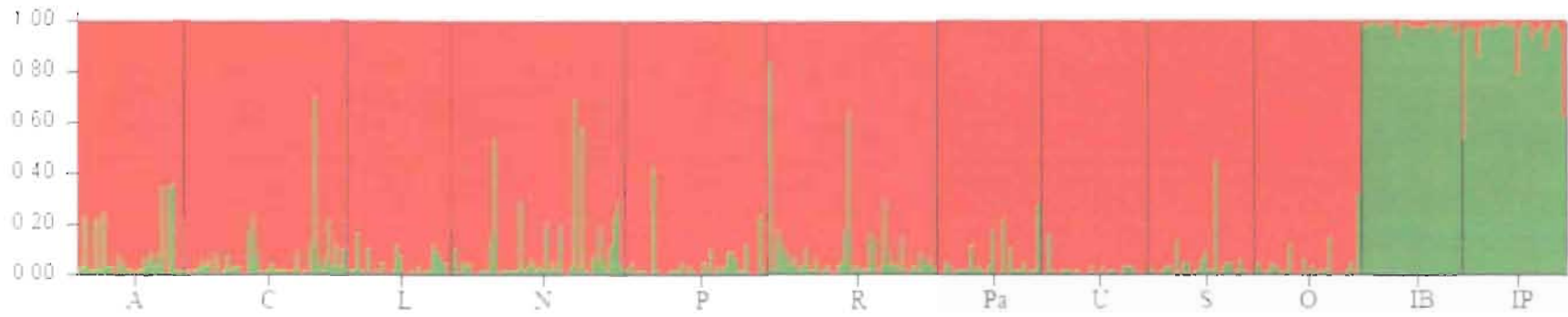
### 3.5.2 Ile-Bizard and Ile-Perrot

Genetic diversity was contrasting between Ile-Bizard and Ile-Perrot, the latter having much higher genetic diversity indices (mean number of alleles per locus, allelic richness,  $H_O$  and  $H_E$ ) than Ile-Bizard and the populations from Montréal island (Table 3.2). Inbreeding coefficient in Ile-Bizard was the highest observed among the 12 populations sampled but was not significant as the confidence interval included zero. Bottlenecks were not identified in IB or IP, with any microsatellite evolution model.

Fisher exact tests revealed that allelic frequencies from Ile-Bizard and Ile-Perrot were distinct from each other and from all populations from Montréal islands ( $P = 0.00001$ ). Similarly, a significant  $F_{ST}$  of 0.092 was observed between IB and IP. Furthermore, all pairwise comparisons involving IB or IP and populations from Montréal island were highly significant ( $p < 0.0001$ ). Values ranged from 0.167 to 0.444 and were all higher than any  $F_{ST}$  pairwise comparisons among Montréal island populations (Table 3.3). The neighbor-joining tree derived from chord distances further revealed that Ile-Bizard and Ile-Perrot are clearly different from the other populations (Figure 3.2). The software Structure suggested an optimal grouping in 2 clusters, one which included individuals from Ile-Bizard and Ile-Perrot, whereas the other group included all populations from Montréal island (Figure 3.3). The overall assignment success was rather high when all populations from Montréal islands were merged in a single group, and 95.7% of all the samples were correctly assigned to their island of origin (Table 3.4B). The Monmonier algorithm (1973) implemented in the software Barrier identified a primary genetic break between Ile-Bizard and the other populations, and a second significant barrier further isolates Ile-Perrot. When computing a multiple regression performed on distance matrices to evaluate the relative contribution of geographical distances and bodies of water to the genetic structure of red-backed salamanders ( $F_{ST}$  values), the variable 'island' was retained in the model ( $b = 0.932$ ,  $P = 0.009$ ) and explained 87.3% of the variation of  $F_{ST}$  values. Genetic diversity indices



**Figure 3.2** Neighbor-joining tree derived from chord distances among 12 red-backed salamander populations sampled from the Montréal agglomeration with bootstrap values indicated along the branches. See Figure 3.1 for population abbreviations.



**Figure 3.3** Results of the clustering analysis implemented in Structure for  $k = 2$ . See Figure 3.1 for population abbreviations.

(allelic richness, HO, HE and FIS) could not be explained by any independent variable in multiple regression analysis.

## **3.6 Discussion**

### **3.6.1 Insularization**

All analyses realized in this study revealed a clear differentiation of red-backed salamander populations found on Montréal island and those on nearby islands, namely Ile-Bizard and Ile-Perrot. These islands are separated from Montréal island by bodies of water ranging from 100-900 m. The swimming abilities of red-backed salamanders are poorly known, but this strictly terrestrial species has rarely been observed in water. Second order streams of 2-7 m width represent partial barriers that impede their movements by about 50% (Marsh et al. 2007). Also, winter dispersal over the frozen water is virtually impossible. Red-backed salamanders are not freeze tolerant (Storey & Storey 1986), and they spend the winter into burrows or ant mounds where they stay partially active until spring (Caldwell 1975). Yet, accidental rafting may rarely occur and allow for limited amount of dispersal over water as proposed for various amphibian species (Measey et al. 2007, Martinez-Solano et al. 2009). Nevertheless, we believe that gene flow among these islands is practically null, which would account for the high population differentiation observed.

Although populations from Ile-Perrot and Ile-Bizard were clearly differentiated from Montréal populations, the distinction between IB and IP was more subtle. Indeed, the differentiation among these populations ( $F_{ST} = 0.09$ ), was the lowest encountered in all pairwise comparisons involving IB and IP and the results from Structure regrouped them in a single cluster. A possible explanation for this situation might be the post-glacial colonization of the islands by different groups of founders. Southern Canada is located at

the convergence of glacial refugia, and it has been shown that the distribution of genetic diversity in this region is imputable to distinct glacial refugia for various species (Mandrak & Crossman 1992, Bernatchez 1997, Murdoch & Hébert 1997, Noël et al. 2005, Tessier et al. 2005). Ile-Bizard and Ile-Perrot might thus have been founded by salamanders coming from a different refugium than Montréal island. This hypothesis is supported by the higher frequencies of the lead-backed morphotype observed on these islands.

Estimates of genetic diversity for the population of Ile-Bizard were much lower than for Ile-Perrot. This low genetic diversity may be explained by the small population size of that particular population. Although no formal evaluation of population size was done, the population density was much lower than that observed at other sites. Despite its relatively large habitat size compared to other populations, field crews had to return four times to this unusual site in order to complete the sampling, whereas other populations could be sampled in a single visit. A possible explanation for the low density of red-backed salamanders on Ile-Bizard may be the presence of the blue-spotted salamander (*A. laterale*), a species much more abundant in this population. Because of their bigger size and aggressive behavior toward *P. cinereus*, Ambystomatids may exclude red-backed salamanders from parts of the habitat (Ducey et al. 1994). Ile-Bizard also had the highest population differentiation values, with all pairwise  $F_{ST} > 0.30$ . This high differentiation may be the result of the insular character and of the rapid genetic drift in that small population.

### **3.6.2 Within Montréal**

Within Montréal island, no clear genetic structure was detected. Although many populations were differentiated, some populations as far as 35 km apart were not. Moreover, the overall assignment success of Montréal populations was rather low (26.5%) and the clustering algorithm implemented in Structure suggested an optimal number of groups of one. One hypothesis to explain this lack of structure might be the presence gene flow

among populations. However, mark-recapture studies showed that the dispersal abilities of red-backed salamanders in natural habitats are thought to be somewhat limited. Both sexes are quite sedentary and their daily movements are restricted (as few as 0.43 m), except for homing behavior or for colonizing new habitats (Kleeberger & Werner 1982, Mathis 1991, Marsh et al. 2004). Yet, range extension since the end of the Pleistocene glaciation suggest dispersal of 80 m / year (Cabe et al. 2007). It has been proposed that the availability of new habitats may have selected for greater dispersal ability along range margins, northern populations thus exhibiting better dispersal capacities (Cabe et al. 2007). In support of this hypothesis, populations of red-backed salamanders located in a continuous habitat in Virginia have been shown to be genetically differentiated at distances of 200 m (Cabe et al. 2007), whereas populations in a continuous habitat in Québec were not differentiated at distances up to 4.1 km (Noël et al. 2007). In the urban setting, components of the landscape such as highways, roads, buildings, parkings or even large grass areas represent inhospitable habitats and likely hinder the dispersal of salamanders (Gibbs 1998b, Marsh et al. 2005, 2008). The dispersal of red-backed salamanders within the highly urbanized landscape of Montréal island is thus implausible. Alternatively, Montréal populations of red-backed salamanders might not have had enough time to diverge since post-glacial colonisation. If the effective population size are high enough, then the effects of genetic drift will be very slow and genetic differentiation might not be detectable yet.

An other hypothesis to explain the lack of genetic structure observed within Montréal might be the insufficient resolution provided by the five microsatellite loci used in this study. Using six microsatellite loci, including five that we used, Cabe et al. (2007) detected significant genetic differentiation for populations as close as 200 m. Although the number of individuals analyzed was similar (384 vs 416 in our study), the total number of alleles encountered was much higher (90 vs 52), thus providing better resolution to detect small differentiation.



On the other hand, genetic differentiation was observed at a small spatial scale for some populations. The populations Parc, Université, Summit and Oratoire were sampled from the Mount Royal which is a highly fragmented mountain located in the heart of Montréal, near the downtown area. Human perturbations in this area date as far back as 1700, when a road was created that bisected the mountain and isolated the populations Summit and Oratoire from the two others. Between 1852 and 1855, two graveyards were established and have been instrumental to the deforestation of the mountain in the following years. Intensive residential, institutional and commercial development have also contributed to create a mosaic of forested patches within the Mount Royal. Three populations from the Mount Royal (Université, Summit and Oratoire) presented an appreciable level of genetic differentiation despite being separated by only 0.7 to 1.7 km. All  $F_{ST}$  values among these populations were significant. Moreover, although the overall success of assignment for the Montréal populations was rather low (26%), over 40% of the salamanders from each of these populations were correctly assigned. Also, the three genetic breaks identified by the software Barrier within Montréal island isolate Université, Summit and Oratoire from each other and from all the other populations. The size of these three populations are unknown, but we believe they are fairly small. Two of them (Université and Oratoire) are found in forested patches less than 1.5 ha, and small patches usually harbor smaller populations than larger patches (Fahrig 2003). The other population (Summit) is located in a city park highly frequented by citizens and their dogs, contributing to the degradation of the habitat. We thus believe these populations have had very low effective population size for a long time, allowing for fast genetic drift and subsequent population differentiation. The low level of genetic differentiation observed for the other population located on the Mount Royal (Park), may be explained by the very large habitat size that sustain large effective population size where the effects of genetic drift are much slower.

### 3.6.3 Genetic diversity in urban populations

Populations inhabiting urban landscapes are usually small and isolated, and may thus be subject to the erosion of genetic diversity through genetic drift and inbreeding. In cities, amphibian populations have been shown to have lower allelic richness and heterozygosity values than in pristine habitats (Hitchings & Beebee 1997, 1998; Arens et al. 2007). Comparisons of genetic diversity values obtained in the present study with those from red-backed salamanders sampled from continuous habitats are concordant with this trend. For example, Cabe et al. (2007) examined the genetic structure of *P. cinereus* in a National Forest in Virginia and found higher number of alleles and observed and expected heterozygosity values. Comparison with a smaller scale study located in Québec also reveals higher genetic diversity in populations within a continuous habitat (Noël et al. 2007). Alternatively, these results could be explained by a latitudinal gradient of genetic diversity following postglacial colonization of newly available habitats, or by a founder effect due to the insular character of the urban populations sampled in the present study.

Some populations sampled in this study were located in small woodlots, sometimes as small as 0.5 ha. However, no inbreeding was detected in any of the populations, even in the smallest. It has been suggested that *P. cinereus* may possess some mechanism for inbreeding avoidance, such as kin recognition (Cabe et al. 2007), a well-known mechanism in salamanders, including members of the family Plethodontidae (Walls & Roudebush 1991, Pfennig et al. 1994, Masters & Forester 1995), usually associated with chemical cues (Waldman 1988). Smell is indeed an important component of the life history of red-backed salamanders as it is used to discriminate neighbors from strangers, differentiate males from females and acquire information on the body size of conspecific salamanders (Jaeger 1981, Mathis 1990).

It is generally believed that genetic diversity is correlated to fitness and survival probabilities (Young et al. 1996, Reed & Frankham 2003, White & Searle 2007, Neel 2008,

Vandewoestijne et al. 2008). The low genetic variation observed in urban red-backed salamanders populations may thus be worrying. Besides, measures of genetic variability inferred from neutral markers such as microsatellite do not always correlate with fitness and survival probabilities (Savolainen & Hedrick 1995, Booy et al. 2000), and so these urban populations are not necessarily doomed to extinction. In a context of global urbanization, it is thus worth protecting forested habitats within the city, moreover that these patches may also harbor rare and threatened species which may be even more sensitive to fragmentation.

### **3.7 Acknowledgments**

We would like to thank all people who helped collecting samples in the field: Anaïs Boutin, Geneviève and Véronique Campbell, Patrick Galois, Olivier Gauthier, Meggy Hervieux, Le Duing Lang, the whole Lapointe family, Isabelle Lefebvre, Geneviève Lepage, Stéphane Marceau, Martin Ouellet, Mathieu Ouellette, Émilie Riopel and Sébastien Rioux Paquette. We would also like to thank Sylvie Comtois from the Ville de Montréal and Christina Idziak at the Arboretum for helpful informations. A special thank to Nathalie Tessier for field and lab support throughout this study and to all members of the LEMEE for constructive comments on an earlier version of the paper. This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, FESP-Université de Montréal and Apogee-Net scholarships to S.N. and NSERC grant no. 0155251 to F.J.L.

## CHAPITRE 4

### Rapid identification of salamanders from the jefferson complex with taxon-specific primers<sup>1</sup>

---

#### 4.1 Résumé

Le complexe de Jefferson est composé de la salamandre de Jefferson (*Ambystoma jeffersonianum*) et de la salamandre à points bleus (*Ambystoma laterale*), en plus de salamandres unisexuées. Celles-ci sont composées de diverses combinaisons du génome nucléaire des deux espèces bisexuées et présentent différents niveaux de ploïdie. Les salamandres unisexuées sont issues d'un événement d'hybridation ancestral et elles partagent un même haplotype mitochondrial qui diffère nettement de celui des espèces bisexuées. Bien que les adultes de *A. jeffersonianum* et *A. laterale* soient faciles à différencier morphologiquement, elle sont difficiles à distinguer des unisexuées qui peuvent présenter des caractères intermédiaires ou associés à l'une ou l'autre des espèces bisexuées. Dans cette étude, nous proposons une nouvelle méthode permettant de distinguer les espèces bisexuées des salamandres unisexuées du complexe de Jefferson. Cette approche utilise des amorces spécifiques situées dans le gène mitochondrial du cytochrome b. Il s'agit d'une technique simple, rapide et non invasive qui nécessite une seule réaction de PCR ainsi que de petits échantillons de tissus qui peuvent être facilement obtenus à partir de spécimens vivants. Nous croyons que cette méthode pourra être utile afin d'identifier rapidement les populations de la salamandre de Jefferson, une étape cruciale pour la conservation de cette espèce menacée.

---

<sup>1</sup> Noël S, Dumoulin J, Ouellet M, Galois P, Lapointe FJ (2008) Rapid identification of salamanders from the Jefferson complex with taxon-specific primers. *Copeia* **2008**, 158-161.

## 4.2 Abstract

The Jefferson complex comprises the Jefferson salamander (*Ambystoma jeffersonianum*) and the blue-spotted salamander (*Ambystoma laterale*), in addition to unisexual salamanders, which present various combinations of the nuclear genome of the two bisexual species and show different levels of ploidy. The unisexuals arose by an ancestral hybridization event and they all share a similar mitochondrial haplotype clearly different from that of the bisexual species. Although adults of *A. jeffersonianum* and *A. laterale* are usually easily differentiated morphologically, unisexuals can be difficult to identify visually because they may possess intermediate characters, or morphological traits from either of their bisexual counterparts. In the present study, we introduce a novel way to discriminate between bisexual and unisexual salamanders of the Jefferson complex based on species-specific primers designed in the mitochondrial cytochrome b region. This molecular approach allows for a simple, rapid and non-invasive identification of unisexuals, using a single polymerase chain reaction (PCR) and small tissue samples that can easily be obtained from live specimens. We believe that this approach will be useful to screen a large number of individuals quickly in order to identify populations of the Jefferson salamander, a crucial step towards the conservation of this threatened species.

## 4.3 Introduction

The Jefferson salamander (*Ambystoma jeffersonianum*) is distributed throughout regions of eastern North America. Locally isolated populations are restricted to places where suitable breeding ponds occur and the species is considered threatened in Canada, and imperiled or vulnerable throughout most of its American range (COSEWIC 2000, NatureServe 2006). This salamander is part of the *Ambystoma* complex, along with three

other bisexual species (*A. laterale* = blue-spotted salamander, *A. texanum* = small-mouthed salamander, and *A. tigrinum* = tiger salamander) and arrays of unisexual salamanders, which are almost exclusively female (Bogart & Klemens 1997). Those unisexuals are of different ploidy levels, containing at least one copy of the *A. laterale* nuclear genome and various combinations of the genome from the other three bisexual species. To designate the genomic composition of salamanders within the *Ambystoma* complex, an informal system was adopted (Lowcock et al. 1987) in which each letter identifies a set of chromosomes (J = *A. jeffersonianum*, L = *A. laterale*, T = *A. texanum*, and Ti = *A. tigrinum*). Twenty different genomic unisexual compositions have been uncovered to date, from diploids (LJ, LT) to pentaploids (LLLLJ). Interestingly, all unisexuals share a similar mitochondrial haplotype clearly different from that of the bisexual species and that is related to the streamside salamander (*Ambystoma barbouri*; Hedges et al. 1992, Bogart, 2003). Thus, it has been postulated that unisexual salamanders arose by an ancestral hybridization event involving an ancestor of *A. barbouri* (Robertson et al. 2006).

Within the *Ambystoma* complex, the smaller Jefferson complex comprises *A. jeffersonianum* and *A. laterale*, in addition to unisexuals containing various combinations of the nuclear genome of the two bisexual species (LJ, LLJ, LJJ, LLLJ, LJJJ, LLJJ, LLLLJ; Bogart 2003). As unisexuals reproduce by gynogenesis or hybridogenesis, they depend on males from the bisexual species for reproduction, and are thus always found in sympatry with either *A. jeffersonianum* or *A. laterale* (Bogart et al. 1989). Although the bisexual adult males can easily be differentiated morphologically from each other and from unisexuals, the unisexuals are difficult to discriminate because they may possess intermediate characters, and often they cannot be differentiated from either one of the bisexual species (Petranka 1998).

Various identification methods have been developed to discriminate members of the Jefferson complex. These include allozyme electrophoresis (Bogart 1982, Bogart et al.

1985), chromosome counts (Sessions 1982), blood erythrocyte size (Uzzell 1964, Wilbur 1976, Austin & Bogart 1982), DNA content by flow cytometry (Lowcock et al. 1991), and microsatellite markers (Julian et al. 2003, Ramsden et al. 2005). However, all techniques except microsatellites require invasive sampling and cannot be applied to preserved tissues or eggs. Most techniques also need costly equipment. In this paper, we introduce a simple, rapid, and non-invasive method to identify salamanders of the Jefferson complex using specific primers to be used in a single polymerase chain reaction (PCR).

#### 4.4 Materials and methods

To design specific primers, we targeted the 307 base pairs (bp) of DNA sequence from the mitochondrial cytochrome b gene used by Hedges et al. (1992). We retrieved 29 Jefferson complex sequences from GenBank, including six from *A. jeffersonianum*, 10 from *A. laterale*, and 13 from unisexuials (accession numbers Z11615-Z11624, Z11627-Z11628, Z11630-Z11632, Z11635, Z11641, Z11643-Z11646, Z11651-Z11652, Z11655-Z11660) distributed among two Canadian provinces (Ontario and Prince Edward Island) and five American states (Connecticut, Illinois, Maine, New York, Vermont). By focusing on sites that discriminate unisexuials from bisexual species, we designed a reverse primer (Hybrid-REV 5'-CAA ATR AAA AAG AAT GAG-3') that is specific to all genomic combinations of unisexuials from the Jefferson complex. When used in conjunction with the primer Universal-FW (5'-ACA GCA GAC ACA TCA TCA-3'), designed to anneal to DNA from all members of the Jefferson complex, a 113-bp fragment is amplified in unisexuials only. To make sure that the absence of this unisexual band is not due to PCR failure, a 258-bp fragment is also amplified in all specimens using the forward primer Universal-FW, and a modification of the reverse primer originally designed by Hedges et al. (1992): Universal-REV (5'-CTC AAA AAG ATA TTT GTC CTC A-3'). Consequently, *A. jeffersonianum* and *A. laterale* should only display the 258-bp fragment, whereas unisexuials should additionally display the specific 113-bp band.

To assess the efficiency of the developed primers, we tested them on frozen museum samples from different localities previously identified by allozymes, flow cytometry or morphology. Additionally, we sampled 72 unknown specimens from deciduous or mixed deciduous-conifer forests from 1999-2005 in eight localities in southern Québec, Canada (Table 4.1). Tail tips, eggs or larvae were collected in the field and tissue was stored in 95% ethanol. DNA extractions were performed with Quick Lysis (Olsen et al. 1996) for all specimens, except museum samples for which a standard phenol-chloroform protocol was used (Sambrook et al. 1989).

We carried out multiplex-PCR amplification in a total volume of 20  $\mu$ l. Each reaction mixture was composed of 2  $\mu$ l 10X buffer (100 mM Tris-HCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 500 mM KCl), 0.5 mM of each dNTPs, 32 mM of MgCl<sub>2</sub>, 2 pmol of the forward universal primer, 4 pmol of the unisexual specific reverse primer, 12 pmol of the universal reverse primer, 1 U of *taq*-Polymerase and approximately 50 ng of template DNA. The PCR profile was an initial denaturation of 2 min at 94 C, followed by 32 cycles of 1 min at 94 C, 90 s at 50 C and 90 s at 72 C, with a final extension of 10 min at 72 C. PCR products were subjected to electrophoresis on a 3% agarose gel, stained with Vistra Green (Amersham Biosciences) and visualized by UV transillumination. We determined the size of the fragments by comparison to a 100-bp ladder.

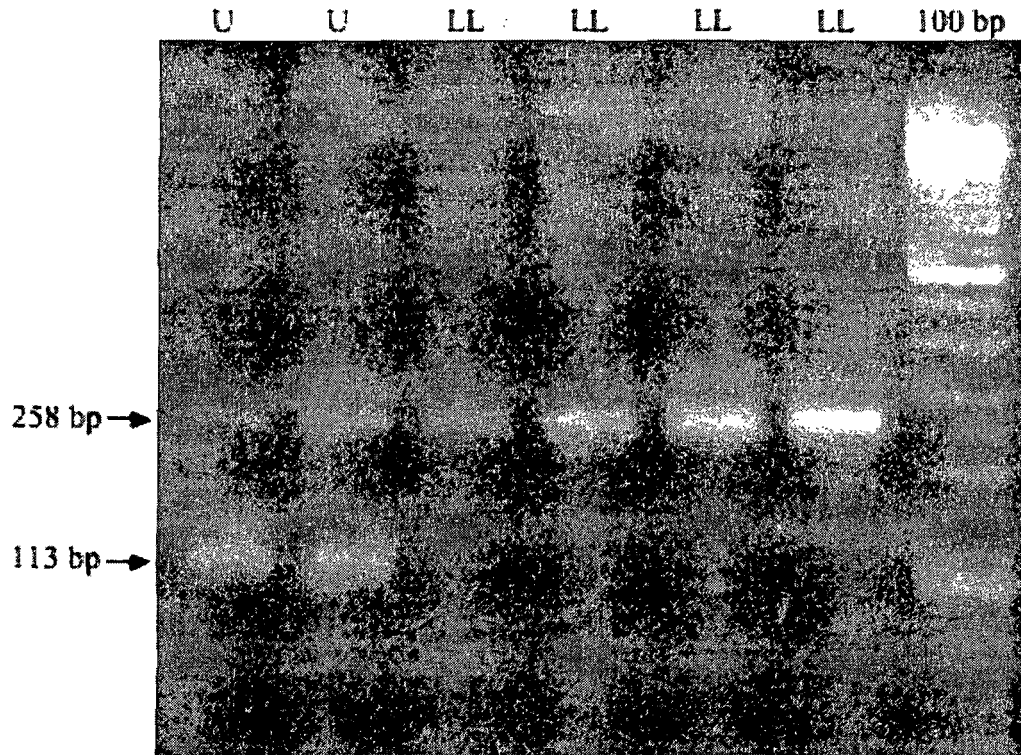
## 4.5 Results

The amplified fragments were of expected sizes for most museum specimens; all displayed the universal 258-bp fragment, whereas unisexuals additionally displayed the specific 113-bp band (Figure 4.1). However, one sample (ROM 17575) from Whiteshell Provincial Park (Manitoba) that was originally designated as *A. laterale* based on morphological criteria was identified as a unisexual using this assay. The sequencing of this



**Table 4.1** Sampling locality of *Ambystoma laterale* (LL) and unisexuales collected in the field from Québec, Canada, and results of molecular identification with specific primers.

Location	Coordinates (NAD83)	Year	Sample type	n	Primers ID
Mont Saint-Hilaire	45°33' N, 73°08' W	1999	Larva	6	Unisexual
Carignan (site 1)	45°23' N, 73°20' W	2004	Tail tip	1	Unisexual
Carignan (site 2)	45°26' N, 73°21' W	2004	Tail tip	1	LL
Carignan (Île Goyer)	45°28' N, 73°16' W	2004	Tail tip	1	LL
Mount Royal	45°30' N, 73°35' W	2004	Tail tip	60	Unisexual (57) LL (3)
Collines d'Oka	45°29' N, 74°04' W	2005	Egg	1	Unisexual
Mont Mégantic	45°25' N, 71°07' W	2005	Tail tip	1	Unisexual
Mont Rougemont	45°29' N, 73°02' W	2005	Tail tip	1	Unisexual



**Figure 4.1** Result of the multiplex-PCR showing the universal universal 258-bp fragment and the 113-bp band specific to unisexuales. LL : *Ambystoma laterale*, U : unisexual, 100 pb : 100 base pair ladder standard.

specimen (accession number DQ490106) using the primers of Hedges et al. (1992) confirmed it as a unisexual.

Most of the field specimens were identified as unisexuals. In the Mount Royal population, where a large number of salamanders were sampled, 95% of the individuals were unisexuals (Table 4.1).

## 4.6 Discussion

Specific primers represent an increasingly popular method to discriminate sister taxa or cryptic species and have also proven useful for the detection of identification errors (Lin et al. 2002, Noël et al. 2004, Tessier et al. 2004). The specific primers developed in this study allow for the quick identification of *Ambystoma* salamanders from the Jefferson complex. Although alternative approaches such as direct sequencing of PCR products, microsatellites, allozyme electrophoresis or chromosome data may also be used to identify particular genotypes or obtain population genetics information, specific primers present the advantage of being simpler, cheaper, and rapid when only the distinction between unisexuals and bisexuals is needed. Although the distribution of *A. jeffersonianum* is not fully known, the species seems to have a patchy distribution and suitable habitat is threatened by urban encroachment. We believe that this non-invasive approach will be useful to quickly screen a large number of individuals to accurately identify populations of *A. jeffersonianum*, a crucial step towards the conservation of this threatened species.

The specific primers developed in this study also allowed us to uncover the presence of unisexuals where only *A. laterale* were thought to occur. In Québec, a unisexual from Mont Mégantic was identified, which represents a slight extension to the known range of unisexuals in this province (Petranka 1998). A specimen from Manitoba that was previously identified morphologically as *A. laterale* was also identified as a unisexual. As

the currently known distribution of LLJ unisexuals is limited to Wisconsin in the west (Petranka 1998), this result could mean that the range of these unisexuals is larger than previously thought. However, two additional museum specimens sampled from the same locality were identified as *A. laterale*. Although it is probable that the two forms co-exist in this area, unisexuals usually outnumber bisexual individuals at a particular site (Lowcock et al. 1991), as observed in the Mount Royal population in Québec. Therefore, the apparent presence of a unisexual in the Whiteshell Provincial Park may also be explained by a labeling error. Additional sampling from this area is thus needed to ascertain the presence of LLJ unisexuals in Manitoba.

#### 4.7 Material Examined

Institutional abbreviations follow Leviton et al. (1985), except for BOG which represents catalogue numbers from J. Bogart (University of Guelph). The method used to identify the specimen is indicated in parentheses: A = allozymes, F = flow cytometry, and M = morphology. *Ambystoma jeffersonianum*: BOG 10539 (A), Adams County, Ohio; BOG 10542 (A), Adams County, Ohio; ROM 16811 (A), Halton County, Ontario; AMNH 129341 (A), Hamden County, Massachusetts; AMNH 129343 (A), Hamden County, Massachusetts; BOG 29574 (A), Litchfield County, Connecticut; BOG 29487 (A), Osego County, New York; BOG 29460 (A), Sullivan County, New York; BOG 19765 (A), Wentworth County, Ontario; BOG 29508 (A), York County, Pennsylvania. *Ambystoma laterale*: ROM 20363 (A), Cochrane County, Ontario; ROM LL579 (A), Ozaukee County, Wisconsin; ROM 17029 (M), Whiteshell Provincial Park, Manitoba; ROM 17574 (M), Whiteshell Provincial Park, Manitoba; ROM 17575 (M), Whiteshell Provincial Park, Manitoba. Unisexual *Ambystoma*: ROM 17660 (F), Haliburton County, Ontario; ROM 17662 (F), Haliburton County, Ontario; ROM 17666 (F), Haliburton County, Ontario; ROM 18685 (A), Peel County, Ontario.

## 4.8 Acknowledgments

We thank R. MacCulloch and R. Murphy from the Royal Ontario Museum, J. Bogart from the University of Guelph, and the American Museum of Natural History for kindly providing museum specimens. We also thank R. Pétel and P. Labonté for help in the field, L. Lowcock for additional information, and all members of the Laboratoire d'Écologie Moléculaire et d'Évolution for their comments on earlier drafts of this manuscript. All manipulations in the field were done according to the animal-welfare protocol CDEAF 05-023 issued by the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal and collecting permits 1999-05-20-104-16-SF, 2004-04-01-112-16-SF, and 2005-05-02-119-16-SF delivered by the Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec. This study was supported by Amphibia-Nature, the Direction des sports, des parcs et des espaces verts de la Ville de Montréal, the Gault Nature Reserve of McGill University, Nature-Action Québec, the Parc national du Mont-Mégantic, the Parc national d'Oka, NSERC scholarship to S. Noël, and NSERC grant no. 0155251 to F.-J. Lapointe.

## CHAPITRE 5

### Genomotype frequencies and genetic diversity in urban and preserved populations of blue-spotted salamanders (*Ambystoma laterale*) and related unisexuals<sup>1</sup>

---

#### 5.1 Résumé

La salamandre à points bleus (*Ambystoma laterale*) et la salamandre de Jefferson (*A. jeffersonianum*) font toutes deux partie du complexe *Ambystoma*, qui comprend également des salamandres unisexuées présentant différents niveaux de ploïdie et diverses combinaisons de génomes nucléaires, ou génotypes. Le mode de reproduction de ces salamandres unisexuées ne permet pas la recombinaison, puisque les femelles se reproduisent principalement par gynogenèse. L'objectif de cette étude était d'obtenir des informations sur la répartition géographique et la distribution de la variabilité génétique des populations du sud du Québec. Pour ce faire, nous avons étudié cinq populations du complexe *Ambystoma*, dont l'une provenant d'une grande ville (Montréal) et les autres de zones préservées. L'analyse de l'ADN mitochondrial et de six microsatellites a été effectuée. Les résultats révèlent que la fréquence des génotypes varie fortement, certaines populations étant principalement composées de *A. latérale*, alors que d'autres sont principalement constituées d'unisexuées. Des salamandres unisexuées diploïdes, triploïdes et tétraploïdes se retrouvent dans certaines de ces populations. L'une des populations analysées semble être constituée uniquement de salamandres unisexuées LJ, ce qui soulève certaines questions quant au mode de reproduction employé dans cette population.

---

<sup>1</sup> Noël S, Labonté P, Lapointe FJ (2008) Genomotype frequencies and genetic diversity in urban and preserved populations of blue-spotted salamanders (*Ambystoma laterale*) and related unisexuals. Sera soumis pour publication à *Journal of Herpetology*.

Finalement, la population située dans un milieu urbain présente une faible diversité génétique, et certaines hypothèses sont amenées pour tenter d'expliquer cette situation.

## 5.2 Abstract

The blue-spotted salamander (*Ambystoma laterale*) and the Jefferson salamander (*A. jeffersonianum*) are both part of the *Ambystoma* complex, which also includes unisexuals of various ploidy levels and genome composition, referred to as genomotypes. The reproductive mode of these unisexuals do not allow for genetic recombination, as females reproduce mainly through gynogenesis. The objective of this study was to obtain information on the geographical distribution of genomotypes and the repartition of genetic diversity in southern Québec. To do so, we examined populations of the *Ambystoma* complex from five populations, including one from a city and others from preserved areas. Genetic analysis using mitochondrial DNA and six microsatellite loci were performed. Results revealed that genomotype frequencies vary greatly, as some populations were mainly composed of *A. laterale*, while unisexual were clearly predominant in others. Diploid, triploid and tetraploid unisexuals were found in some of the populations. One of the populations analyzed appears to be composed only of LJ unisexual salamanders, which raises some questions about the mode of reproduction used in this population. Finally, the population located in an urban environment presents a low genetic diversity, and some hypotheses are proposed to explain this situation.

## 5.3 Introduction

Although sexual reproduction is the norm within vertebrates, unisexual populations have been recorded in more than 80 species complexes of fishes, amphibians and reptiles worldwide representing 22 genera (Vrijenhoek et al. 1989, Alves et al. 2001). Such unisexual populations are always of hybrid origin, and are exclusively composed of females

(or nearly so). They often include polyploids and their reproductive modes do not allow for genetic recombination (Dawley 1989). Unisexual taxa may reproduce by parthenogenesis, gynogenesis or hybridogenesis. Parthenogenesis consists in the production of unreduced eggs that develop in the absence of sperm, whereas sperm is required to activate the embryogenesis, but it is not incorporated, in gynogenesis. In both cases, the offsprings are genetically identical to the mother. In hybridogenesis, the sperm is incorporated in a reduced egg that contains only the maternal genome, which is transmitted clonally while the paternal genome is discarded at each generation. The impossibility to purge deleterious mutations may explain the scarcity of unisexuals within vertebrate taxa and their relatively short evolutionary lifespan (Muller 1964, Barton & Charlesworth 1998, Schlupp 2005). Moreover, in the absence of recombination, unisexuals are unable to generate genetic variability, except from mutations, and this greatly reduces their ability to adapt to changing environments (Crow 1994).

The *Ambystoma* complex consists of four bisexual species (*A. laterale*, *A. jeffersonianum*, *A. texanum*, and *A. tigrinum*), and a number of unisexuals of various ploidy levels (diploids, triploids, tetraploids, and pentaploids, Bogart 2003). These unisexuals contain at least one copy of the nuclear genome of *A. laterale*, and various combinations of the nuclear genome of the other bisexual species. Regardless of their nuclear genome combination, all unisexuals share a similar mitochondrial haplotype that is closely related to *A. barbouri* (Hedges et al. 1992, Bogart 2003, Robertson et al. 2006, Bogart et al. 2007). It is thus believed that a single hybridization event with a female *A. barbouri* gave rise to the unisexual lineage about 3 million years ago (Bogart et al. 2007). Members of the *Ambystoma* complex have a particular reproductive mode, sometimes referred to as kleptogenesis, in which sexual and non-sexual elements are incorporated (Bogart et al. 2007). Female unisexuals reproduce mainly through gynogenesis, but the incorporation of sperm into the egg occasionally leads to ploidy elevation (Ramsden 2008).



Within the *Ambystoma* complex, it is particularly difficult to differentiate *A. laterale* or *A. jeffersonianum* from related unisexuales. Seven combinations (referred thereafter as genomotypes, sensu Lowcock 1994) containing nuclear genomes from *A. laterale* (L) and *A. jeffersonianum* (J) have been uncovered: LJ, LLJ, LJJ, LLJ, LJJJ, LLJJ, LLLLJ (Bogart 2003). It is very difficult to tell apart these unisexuales from members of the pure species (LL and JJ) on the basis of morphological characteristics alone, so that genetic identification methods based on isozymes, mtDNA or microsatellites have been developed (Bogart & Klemens 1997, Ramsden et al. 2006, Noël et al. 2008). Because unisexuales are dependent upon male from bisexual species for reproduction, they are usually found in sympatry with either *A. laterale* or *A. jeffersonianum* (Bogart et al. 1989). On the other hand, although the distribution ranges of the two bisexual species overlap, they are hardly ever found in sympatry (Bogart & Klemens 1997, 2008; Bogart et al. 2007). The prevalence of the bisexual species and of each genomotype is highly variable, with populations from eastern USA and southern Ontario composed entirely of *A. laterale* or *A. jeffersonianum*, while unisexuales are predominant in other populations

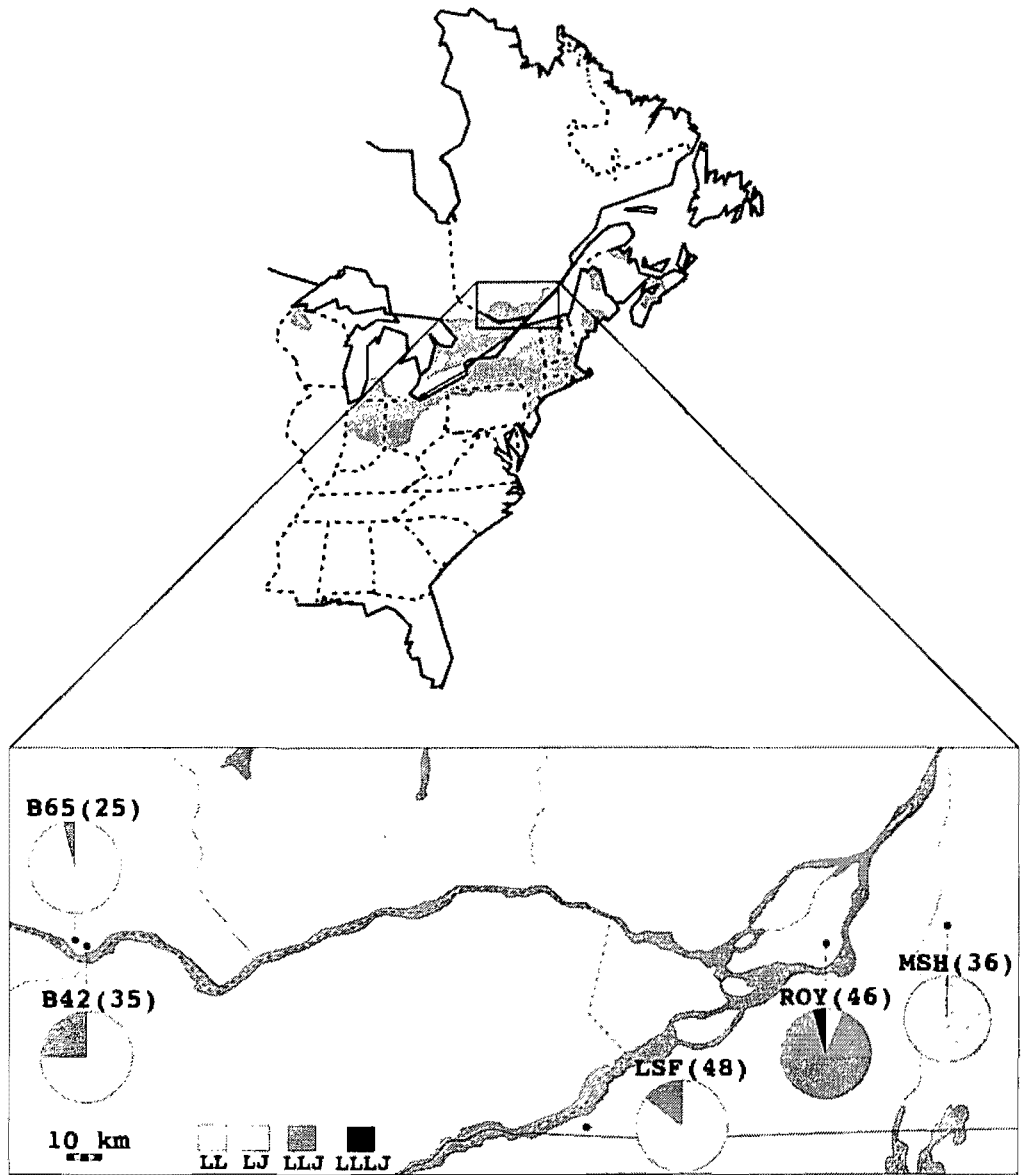
The objective of this study is to acquire information on the geographical distribution of genomotypes and the repartition of genetic diversity in *Ambystoma* populations of southern Québec, a region that has never been thoroughly studied and that is close to the northernmost limit of its range. *Ambystoma* populations from this area may thus present local adaptattions to marginal ecological conditions. We examined five populations, including one from Montréal city, and others from preserved areas, using mtDNA and microsatellites. The frequency of each genomotype was recorded in each population and various index of genetic variation were measured.

## 5.4 Methodology

### 5.4.1 Sampling

Sampling was conducted in April 2006 in breeding ponds from three protected sites (Figure 5.1). The first site, Mont Saint-Hilaire (**MSH**, N 45° 32' 46.3'', W 73° 10' 11.8''), is one of the Monteregian Hills (Adams 1903). It is part of the UNESCO's world network of biosphere reserves, is designated as a Migratory Bird Sanctuaries by Environment Canada, and is also a protected area that has been managed by McGill University since 1958. Individuals were also collected from two different sampling areas in Bristol-les-Mines, an area of high biodiversity that harbors reproduction sites for species at risk such as the musk turtle (*Sternotherus odoratus*) and the eastern ribbon snake (*Thamnophis sauritus*). The first site (**B42**, N 45° 28' 41.5'', W 76° 19' 30.3'') is a permanent pond located 3.1 km from the other reproduction site (**B65**, N 45° 29' 20.4'', W 76° 21' 40.1'') where salamanders were also sampled. The third site is the national wildlife area of Lac St-Francois (**LSF**, N 45° 01' 16.5'', W 74° 29' 24.1''). It is a 1446 ha zone protected by Environment Canada, which harbors exceptional wetland and forested habitats that shelter rare animal and plant species. Salamanders were also collected in May 2007 from the Mount Royal (**ROY**, N 45° 30' 08.8'', W 73° 35' 19.1''), a highly fragmented mountain located in the hearth of Montréal. This last population is located in an urban park surrounded by dense urban matrix. It is thus completely isolated. Individuals were collected from the woods adjacent to the marsh where they reproduce in the spring.

All sampling sites were located outside the distribution range of the Jefferson salamander. Consequently, we expected to collect only blue-spotted salamanders and unisexuals. Approximately 1 cm was removed from the tail of each individual, and stored in 95% ethanol at room temperature until further DNA extraction.



**Figure 5.1** Known range of unisexual *Ambystoma* in eastern North America (grey area) with insert showing the sampled populations with associated genototype frequencies of *A. laterale* (LL) and unisexuals (LJ, LLJ, LLLJ).

### 5.4.2 DNA extraction and amplification

DNA was extracted using a Qiagen Tissue Kit. The identity of each individual (*A. laterale* or unisexual) was first determined by mtDNA assessment with specific-primers used in multiplex reactions (Noël et al. 2008). The primers used in this method amplify a 113-bp fragment of the cytochrome b in unisexuales, and a 258-bp control fragment in unisexuales and *A. laterale*. It represents a fast way to discriminate between bisexual species and unisexuales, but cannot be used to infer the ploidy or the particular genototype of each individual. To do so, we used two microsatellite loci (AjeD94, AjeD346) that have been shown to correctly identify genototype in the *Ambystoma* complex (Ramsden et al. 2006). These loci present discrete allele size for the genomes of *A. laterale* and *A. jeffersonianum*. Four additional microsatellite loci presenting similar or overlapping allele size for the L and J genomes were amplified (AjeD23, AjeD37, AjeD283, AjeD422; Julian et al. 2003) and the six loci were used to estimate genetic diversity within populations. All amplifications were carried out in 25 µl reactions containing 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 50 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM of each dNTP, 4 pmol of fluorescently labeled forward primer, 4 pmol of reverse primer, 0.5 U of Taq DNA polymerase, and 50–100 ng of template DNA. PCR conditions consisted of an initial denaturation of 2 min at 94°C, followed by 30 cycles of 94°C for 45 s, 53°C for 45 s, 72°C for 30 s, with a final extension of 10 min at 72°C. Allele sizes were determined using an ABI 3730 automated sequencer.

### 5.4.3 Data analyses

Because the two breeding sites from Bristol-les-Mines (**B42** and **B65**) are closely located, they may not represent independent sampling sites. To evaluate if the two populations should be pooled together, different tests were performed. First, a Fisher exact test written in R was employed to assess whether the frequencies of genotypes differed in **B42** and **B65** (R Development Core Team 2008). To test for difference in allelic

frequencies, triploids had to be recoded to allow comparisons with diploids. To do so, each triploid was recoded as a diploid and a dummy individual was created to account for the third allele when needed. Fisher exact tests across all loci were computed in Genepop version 3.2 (Raymond & Rousset 1995). The same tests were then performed on all populations to detect any population differentiation based on genomotype or allelic frequencies.

Various measures were used to evaluate genetic diversity within populations. When different genomotypes were found in sympatry, genetic diversity was estimated for each genomotype independently. The mean number of alleles per locus ( $k$ ) and the number of private alleles ( $p$ ) were recorded for each population. Allelic richness, a measure of the number of alleles per locus corrected for differences in population size with a resampling procedure (Petit et al. 1998) was evaluated for all populations where LL genomotypes were predominant. Heterozygosity was measured differently depending on the genomotype : observed heterozygosity was used for diploids, while allelic diversity ( $D$ , Magoulas et al. 2000) was used for triploid. This index differentiates between triploids with two or three alleles. For each locus, an individual was assigned a score of 0, 1 or 2 according to whether it possessed 1, 2 or 3 alleles respectively. Allelic diversity values range between 0 (for a populations where all individuals are homozygotes at all loci), to 2 (where all individuals possess three alleles at each locus). The G:N index was also employed (Halkett et al. 2005) by calculating the ratio of distinct multilocus genotypes over the sample size. G:N ranges from 0, when all individuals in a population share the same genotype, to 1 when all individuals have a unique genotype. Finally, genetic diversity was also described using the method proposed by Menken et al. (1995). To do so, the effective number of clones (ENC,  $1/\sum p_i^2$ ), the genotypic diversity (CD:  $1-\sum p_i^2$ ) and the genotypic evenness (CE: ENC / nb. of unique genotypes) were recorded for each population. CE is a relative measure of the distribution of genotypes that is comparable among populations, when sampling sizes vary.

This index is constrained between 0 and 1, where a value of 1 means that all genotypes are equally distributed.

Finally, we evaluated the power of the microsatellite loci to differentiate distinct genotypes in the blue-spotted salamander and the various unisexuals. This was done by plotting the proportion of unique multilocus genotypes obtained for each number of loci ( $n = 1$  to 6), as in Delmotte et al. (2002). Three random combinations were used for numbers under 6.

## 5.5 Results

### 5.5.1 Population composition

The analysis of mtDNA with specific primers allowed us to identify a total of 94 *A. laterale* (LL) and 96 unisexuals in all populations. The genomotype LL was predominant in three populations: **B42** (74%,  $\chi^2 = 8.257$ ,  $P = 0.0041$ ), **B65** (96%,  $\chi^2 = 21.160$ ,  $P < 0.0001$ ) and **LSF** (85%,  $\chi^2 = 24.083$ ,  $P < 0.0001$ ), whereas it was uncommon in **ROY** (7%,  $\chi^2 = 34.783$ ,  $P < 0.0001$ ) and completely absent in **MSH** (Figure 5.1). The analysis of the microsatellite loci used to infer the genomotype (AjeD94, AjeD346) further revealed that all unisexuals from **B42**, **B65** and **LSF** were triploids, whereas the unisexuals from **MSH** were diploids. All unisexuals from **ROY** were determined as triploids on the basis of those two loci. However, two individuals from this population showed a tetraploid pattern at loci AjeD283, and were thus identified as tetraploids.

The locus AjeD94 exhibited different alleles from what has been reported before (Ramsden et al. 2006), and allele sizes were not discrete for *A. laterale* and *A. jeffersonianum* genomes. Consequently, this locus was not used to discriminate LLJ from LJJ individuals and it was only employed for ploidy determination. Allele sizes at the

other loci allowed the identification of all triploids as LLJ and unisexual diploids as LJ. The tetraploids from **ROY** exhibited the pattern of a LLJ triploid at all loci except for AjeD283 for which it presented four alleles (Table 5.1). Because allele sizes overlap for *A. laterale* and *A. jeffersonianum* genomes at this locus, it was not possible to distinguish between LLLJ and LLJJ on the basis of the information provided by the six loci analyzed.

### 5.5.2 Population differentiation

The two tests performed to assess whether the two populations from Bristol-les-Mines (**B42** and **B65**) should be pooled provided similar results. The frequency of genotypes was significantly different in the two populations ( $P = 0.035$ ), and the Fisher exact test revealed that salamanders from these populations have different allelic distributions ( $P < 0.00001$ ). Moreover, snout-vent length measurements also showed that these populations are differentiated (Labonté, unpublished data).

Exact tests on genotype frequencies for all of populations revealed that most populations are differentiated, except for two pairs (**LSF-B42**,  $P = 0.263$  and **LSF-B65**,  $P = 0.250$ ). The three populations concerned (**B42**, **B65** and **LSF**) consist of only two genotypes (LL and LLJ), with a majority of LL (74%, 96% and 85% respectively, Figure 5.1). However, those three populations were well differentiated on the basis of allelic frequencies, as all populations were significantly different ( $P < 0.00001$ ).

### 5.5.3 Genetic diversity

The number of alleles at the six microsatellite markers ranged from 13 (AjeD37) to 22 (AjeD346), for a total of 93 alleles observed across all loci (Table 5.1). The LL genotype harbored a higher total number of alleles (74) than other genotypes (LLJ = 60, LJ = 16). Allelic richness and observed heterozygosity within LL was similar

**Table 5.1** Alleles exhibited at six microsatellite loci for five populations of the *Ambystoma* complex. Alleles known to be exclusively from *A. laterale* genome are shown in bold while alleles known to be exclusively from *A. Jeffersonianum* are shown in italic. For unisexuals, all unique multilocus genotypes encountered are presented, and alleles that differ from the main genotype are underlined. Since all LL salamanders had a unique multilocus genotype, only the alleles present in each population are shown.

Pop.	Genomotype	n	AjeD23	AjeD37	AjeD94	AjeD283	AjeD346	AjeD422
<b>B42</b>	LLJ	2	236-240	174-186-214	<b>146</b> -194	144-164-172	<i>164-280-300</i>	208-228-248
	LLJ	2	236-244-248	174-186-210	<b>146</b> -194	144-164-172	<i>164-280-300</i>	208-228-248
	LLJ	2	236-244-248	174-186-210	<b>146</b> -194-198	144-164-172	<i>164-280-300</i>	208-228-248
	LLJ	1	236-240-248	174-186-214	<b>146</b> -194	144-164-172	<i>164-280-300</i>	208-248
	LLJ	1	236-240-244	174-186-214	<b>146</b> -194	144-164-172	<i>164-280-300</i>	208-228-248
	LLJ	1	236-240-248	174-186-214	<b>146</b> -194	144-164-172	<i>164-280-300</i>	208-228-248
	LL	26	224	166	<b>142</b>	148	<b>260</b>	216
			228	170	<b>146</b>	156	<b>264</b>	220
			232	174	<b>150</b>	160	<b>268</b>	224
			236	178	162	164	<b>272</b>	228
	240		182	170	168	<b>276</b>	232	
	244			182	172	<b>284</b>	236	
	248			186	176	<b>288</b>		
	252			190	180	<b>292</b>		
	256			194	184	<b>296</b>		
				198	192	<b>300</b>		
				202				



Pop.	Genomotype	n	AjeD23	AjeD37	AjeD94	AjeD283	AjeD346	AjeD422	
<b>B65</b>	LLJ	1	236-244-252	174-186-214	<b>146</b> -194	144-164-172	<b>164-280-296</b>	208-228-248	
	LL	24	220	154	<b>146</b>	148	<b>260</b>	212	
				232	166	<b>150</b>	152	<b>264</b>	216
				236	170	182	156	<b>268</b>	220
				240	174	186	160	<b>272</b>	224
				244	178	190	164	<b>276</b>	228
				248	182	194	168	<b>280</b>	232
				252		198	172	<b>284</b>	236
				256		202	176	<b>288</b>	
						206	180	<b>292</b>	
					184	<b>296</b>			
						<b>300</b>			
<b>LSF</b>	LLJ	3	228-244	182-218	170-186-194	144-156-160	<b>196-260-276</b>	224-232-244	
	LLJ	1	220-236-252	174-218	182-194	148-164-172	<b>192-272-276</b>	224-228-252	
	LLJ	1	220-236-248	174-218	182-194	148-164-172	<b>192-272-276</b>	224-228-252	
	LLJ	1	244-244	182-218	170-186-194	144-156	<b>196-260-276</b>	224-232-244	
	LLJ	1	200-248	174-218	<b>146</b> -186-198	152-156	<b>180-252</b>	228-232	
	LL	41	216	166	<b>146</b>	126	<b>236</b>	208	
				224	170	174	<b>244</b>	212	
				232	174	178	152	<b>248</b>	216
				236	178	182	156	<b>252</b>	220
				240	182	186	160	<b>256</b>	224
			244	186	190	164	<b>260</b>	228	
			248	190	194	168	<b>264</b>	232	
		252		198	172	<b>268</b>	240		

Pop.	Genomotype	n	AjeD23	AjeD37	AjeD94	AjeD283	AjeD346	AjeD422	
<b>LSF</b>	LL		256		202	180	<b>272</b>	244	
			260				<b>276</b>	252	
								<b>280</b>	256
								<b>284</b>	
								<b>288</b>	
								<b>292</b>	
						<b>296</b>			
<b>MSH</b>	LJ	32	228-232	174-238	194-222	148-172	<i>180-264</i>	224-252	
	LJ	1	228-232	174-238	194-222	148- <u>168</u>	<i>180-264</i>	224-252	
	LJ	1	228-232	174-238	194-222	148-172	<i>180-<del>260</del></i>	224-252	
	LJ	1	228-232	174-238	194- <u>226</u>	148-172	<i>180-264</i>	224-252	
	LJ	1	228-232	174-238	194-222	148-172	<i><u>184-264</u></i>	224-252	
<b>ROY</b>	LLJ	37	228-248	174-182-202	186-206-210	148-152-172	<i>176-<del>280-288</del></i>	220-232-244	
	LLJ	1	228-248	174-182-202	186-206- <u>218</u>	148-152-172	<i>176-<del>280-288</del></i>	220-232-244	
	LLJ	1	228-248	174-182-202	186-206-210	148-152-172	<i>176-<del>284-288</del></i>	220-232-244	
	LLJ	1	228-248	174-182-202	186-206-210	148-152-172	<i><u>182-280-288</u></i>	220-232-244	
	LLJ	1	228-248	174-182-202	186-206- <u>214</u>	148-152-172	<i><u>182-280-288</u></i>	220-232-244	
	LLL?	1	228-248	174-182-202	186-206-210	148-152-172- <u>180</u>	<i>176-<del>280-288</del></i>	-	
	LLL?	1	228-248	174-182-202	186-206-210	148-152-172- <u>184</u>	<i>176-<del>280-288</del></i>	-	
	LL	3	244	170	<b>146</b>	172	<b>284</b>	224	
				174		180	<b>292</b>	228	
					184				

for the three populations where this genototype was predominant (**B42**, **B65** and **LSF**) but observed heterozygosity and allelic richness was rather low on **ROY** (Table 5.2). On the other hand, all LJ individuals from **MSH** were heterozygotes at all loci owing to the presence of genomes from *A. laterale* and *A. jeffersonianum*. Allelic diversity, the measure of heterozygosity used for triploids, was relatively high for all populations of LLJ.

The ratio of unique multilocus genotypes was 1 for all LL populations as each individual presented a unique genotype. Contrarily, few unique genotypes were recovered from populations composed mainly (**ROY**, G:N = 0.17) or entirely (**MSH**, of unisexuales (G:N = 0.14); all individuals presented the same genotype, except a few that differed by a single locus from the main multilocus genotype, often by a single step mutation.

The number of loci required to discriminate all of the multilocus genotypes differed among genotypes (Figure 5.2). For LL individuals, the analysis of three loci correctly detected 98% of the multilocus genotypes present in the sample, whereas four microsatellite were needed to detect all of the 94 genotypes present. For unisexuales (LLJ or LJ), the number of unique genotypes detected did not reach a plateau and we suspect that additional loci would reveal further unique genotypes within these genotypes.

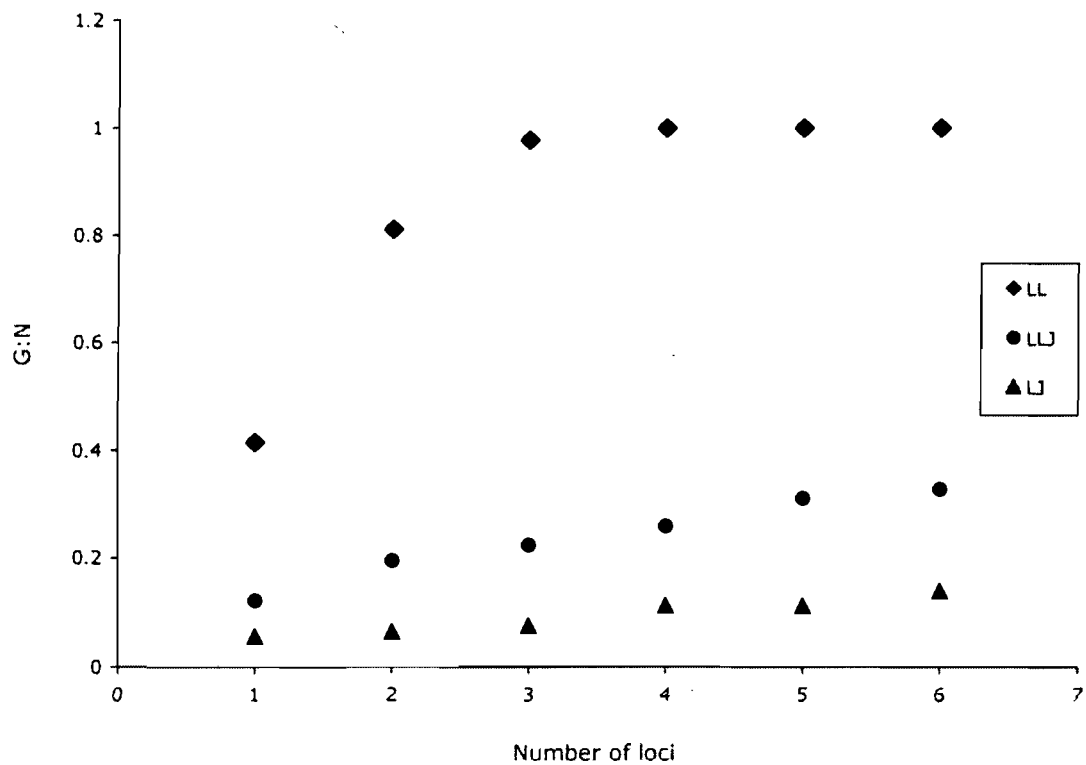
## 5.6 Discussion

The analysis of DNA at six microsatellite loci allowed us to acquire data on the genotype repartition within the *Ambystoma* complex in southern Québec. Few individuals had previously been genotyped by Bi et al. (2008), but with only one to eight individuals per site, the sampling was not sufficient to draw conclusions about the relative frequency of the different genotypes. Results of the present study revealed that the genotype occurrence varies widely across populations, and the majority of the sampled populations had significantly different genotype frequencies. Because unisexuales usually

**Table 5.2** Number of individuals, mean number of alleles per locus (k), number of private alleles (p), allelic richness (A), observed heterozygosity ( $H_0$ ), allelic diversity (D), the ratio of unique multilocus genotypes (G:N), effective number of clones (ENC), genotypic diversity (CE) and genotypic evenness (CE) for populations of *A. laterale* and related unisexuals sampled in southern Québec.

Population	n	k	p	A*	$H_0$	D	G:N	ENC	CD	CE
Bristol-les-Mines (B42)										
LL	26	8.5	5	8.4 (3.9)	0.75	-	1	26	0.96	1
LLJ	9	3.3	4	-	-	1.73	0.68	5.4	0.81	0.9
Bristol-les-Mines (B65)										
LL	24	8.5	3	8.2 (3.9)	0.68	-	1	24	0.96	1
LLJ	1	3	2	-	-	1.83	1	1	0	1
Lac St-François (LSF)										
LL	41	10.2	17	8.6 (3.6)	0.72	-	1	41	0.98	1
LLJ	7	5.8	16	-	-	1.56	0.81	3.77	0.73	0.75
Mont St-Hilaire (MSH)										
LJ	36	2.7	-	-	1.00	-	0.14	1.26	0.21	0.26
Mount Royal (ROY)										
LL	3	1.8	0	-(1.8)	0.33	-	1	3	0.67	1
LLJ	41	3.5	10	-	-	1.83	0.17	1.35	0.26	0.27
LLLJ	2	4	-	-	-	-	1	2	0.5	1

\* Allelic richness is presented based on the resampling of 24 individuals when considering populations **B42**, **B65**, **LSF** and then in parentheses based on the resampling of 3 individuals when also considering the population **ROY**.



**Figure 5.2** Proportion of unique multilocus genotypes (G:N) observed for 1-6 microsatellites used to determine genotypes for *A. laterale* (LL), diploid and triploid unisexuals (LJ and LLJ).

produce only female offsprings, populations where LL and unisexals live in sympatry could rapidly become dominated by unisexals. Indeed, it is generally believed that unisexals outnumber bisexual salamanders in a population (Bogart & Klemens 1997). However, it is not uncommon to encounter populations in which the bisexual species represent the most abundant genomotype. Large-scale sampling in eastern USA showed that out of 14 populations with a minimum of 25 salamanders sampled, 5 were composed of a majority of blue-spotted salamanders (Bogart & Klemens 1997, 2008). In the present study, we uncovered one population where LL and unisexals were found in sympatry and where the unisexals outnumber the blue-spotted salamanders (**ROY**), and three other populations where LL was predominant. The high proportion of LL in some populations might be explained by differential courting and mating success. Breeding experiments showed that a higher number of spermatophores and fertilized egg masses are generated when male *A. laterale* breed with female *A. laterale* compared to unisexals (Uzzell 1969). However, the population **B65**, with as few of 4% of unisexals seems to represent an abnormal situation, since proportions of unisexals are at least 20% when found in sympatry with LL (Bogart & Klemens 1997, 2008).

An other unusual situation was found in Mont St-Hilaire, where not a single bisexual salamander was detected and all samples collected were identified as LJ. Diploid unisexals are thought to occur from ploidy reductional events from triploids (Bogart et al. 2007, Bogart & Klemens 2008). Although unisexals typically reproduce via unreduced eggs, it has been shown that reduced eggs are sometimes produced (Bogart 2003). Although this genomotype is encountered across the range of unisexals, it is relatively rare and represents less than 15% of the unisexals sampled in eastern USA (Bogart & Klemens 1997, 2008). Diploid unisexals usually occur in populations where other unisexual genotypes are also present, and are always found in sympatry with either *A. laterale* or *A. jeffersonianum*. The highest proportion of LJ previously reported was 42% for a population in New York state (Bogart & Klemens 2008).

With its *Ambystoma* population composed entirely of LJ, Mont St-Hilaire thus seems unique and raises an important question : how do LJ unisexuals reproduce? The absence of *A. laterale* in the population challenges the belief that *Ambystoma* unisexuals are dependent upon a male from a sympatric bisexual species to trigger embryogenesis or to participate in hybridogenesis. This brings up the hypothesis that they may reproduce by parthenogenesis (Labonté et al., in prep.). Alternatively, in the absence of *A. laterale* males, LJ diploids may use other *Ambystoma* species to activate the developpement of eggs, in a similar way as unisexual LJJ females are dependent upon *A. texanum* in populations where *A. jeffersonianum* is absent (Spolsky et al. 1992). However, the only other Ambystomatid found in Mont St-Hilaire is the spotted salamander (*Ambystoma maculatum*), which is not part of the *Ambystoma* complex and only distantly related to *A. laterale* (Shaffer et al. 1991). In experiments where LJJ unisexual eggs were inseminated with *A. maculatum* sperm, no embryo developed normally. This indicates some kind of incompatibility, although eggs inseminated with *A. texanum* sperm developed normally and hatched (Morris & Brandon 1984). It thus seems doubtful that LJ unisexuals from Mont St-Hilaire depend on *A. maculatum* males for reproduction, but LJ males may be present in the population. Unisexual males, including some from the genomotype LJ, have been uncovered in a few sites in eastern USA and represent about 1% of all the unisexuals identified (Bogart & Klemens 1997, 2008). Likewise, *A. laterale* males could also be present in the population at low frequency, and the sampling may have been too limited to detect males from either genomotype. However, surveys from previous years never uncovered a single male, out of the 175 salamanders sampled (Environnement Canada, unpublished data). Further studies as thus needed to shed light on the reproductive mode of this peculiar population.

Mount Royal harbored very few blue-spotted salamanders (LL), and the majority of the population was composed of unisexuals. It was the only population where tetraploids were found, albeit at a very low frequency (less than 5% of the unisexuals), a similar proportion as that encountered in american populations (less than 10%, Bogart & Klemens 1997, 2008). Tetraploids can be artificially produced in the laboratory (Bogart et al. 1989)

and are formed by the incorporation of the sperm in the unreduced egg of a triploid, leading to ploidy elevation (Bogart & Klemens 2008). Because allele sizes are not discrete for *A. laterale* and *A. jeffersonianum* for the only microsatellite locus that showed a tetraploid pattern, it was impossible to determine the specific genomotype of the tetraploids. However, if we assume they were formed by ploidy elevation from an LLJ individual with contributing sperm from an LL male, we can infer that their genomotype is LLLJ. Only one microsatellite showed a tetraploid pattern, whereas three loci were tri-allelic, one was bi-allelic and one could not be amplified. The lack of a tetraploid pattern at some loci can be the result of the incorporation of the sperm from a male that carried some of the same alleles as the female. The situations where alleles from the tetraploids were not recovered from the LL may be explained by an incomplete sampling of *A. laterale* individuals present in the population. Alternatively, DNA mutation or allele loss may also occur, as revealed by analyses of individual genotypes from egg masses (Bogart et al. 2007).

The two populations composed mainly or entirely of unisexuals (**MSH** and **ROY**) had a very low ratio of unique multilocus genotype. Indeed, Almost all unisexuals shared the same genotype, except some individuals that differed from the predominant multilocus genotype by a single or two-step mutation at one locus, a situation also observed in other species that reproduce mainly through gynogenesis (e.g. Binet & Angers 2005). In contrast, the measures of genetic variation based on heterozygosity were rather high, because of the combination of genomes from *A. laterale* and *A. jeffersonianum*. On the other hand, the LL individuals from **ROY**, exhibited very low observed heterozygosity. Although this measure was estimated with only three individuals, allelic richness based on the resampling of three individuals was also very low when compared to **B42**, **B65** and **LSF**. The low genetic diversity observed may be caused by the scarcity of LL compared with other populations. Alternatively, these results may be explained by the fact that the **ROY** population is located on an island. Fewer individuals may have colonized this mountain after the retreat of glaciers following the Pleistocene glaciation, leading to such a small genetic diversity. Also, the **ROY** population is located within a dense urban matrix. It is thus restricted to a



fragmented habitat subject to many perturbations, which could account for the small population size and the low genetic diversity observed. Further studies addressing this question with other populations from Montréal and other urban areas would be required to assess this hypothesis.

## **5.7 Acknowledgements**

We would like to thank Simon Bourbeau, Lyne Boutillier, Stephanie Gagnon, Denis Labonté, Isabelle Lefebvre, Nathalie Tessier and Stephane Turgeon for field assistance. This work was supported by Environment Canada, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, FESP-Université de Montréal and Apogee-Net scholarships to S.N. and NSERC grant no. 0155251 to F.J.L.

## **CHAPITRE 6**

### **Conclusion**

---

Mes travaux de doctorat ont porté sur l'analyse des populations montréalaises de deux espèces de salamandres, soit la salamandre cendrée et la salamandre à points bleus. Cette étude s'est effectuée dans un cadre de génétique des populations en utilisant des outils moléculaires, notamment les microsatellites. En guise de conclusion, je désire dans ce dernier chapitre effectuer un bref retour sur les objectifs de départ et souligner les principaux résultats obtenus, tout en discutant des avenues de recherches futures.

#### **6.1 Les salamandres cendrées du Mont-Royal**

Le premier chapitre visait à évaluer l'effet de la fragmentation de l'habitat forestier du Mont-Royal sur la salamandre cendrée. Le Mont-Royal représente un véritable réservoir de biodiversité au coeur de la ville, et quelques populations résiduelles de salamandres y subsistent. On retrouve des salamandres cendrées dans le Parc du Mont-Royal, dans le parc Summit, ainsi que dans deux petits boisés, soit le petit bois de l'Oratoire St-Joseph, et le petit îlot forestier le long de la rue Édouard-Montpetit entre les résidences universitaires et le métro Université de Montréal. Ces populations sont donc isolées les unes des autres par des routes, des étendues gazonnées et des bâtiments. Afin d'évaluer l'effet de cette fragmentation de l'habitat sur les salamandres, ces populations ont été comparées à celles du Mont-Mégantic qui présente un habitat forestier continu. Les résultats des analyses microsatellites démontrent que les populations du Mont-Royal ont une plus faible diversité génétique que celles du Mont-Mégantic et sont génétiquement différenciées, alors que celles du Mont-Mégantic ne le sont pas. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le

flux génique est réduit entre les populations de salamandres du Mont-Royal et qu'elles sont soumises à l'érosion de la diversité génétique par le biais de la dérive génique.

Les couloirs de dispersion représentent une façon intéressante de favoriser la connectivité et les échanges génétiques dans un habitat fragmenté (Beier & Noss 1998, Hilty et al. 2006). Puisque les routes représentent une importante cause de mortalité chez les amphibiens (Mazerolle 2004, Elzanowski et al. 2009, Langen et al. 2009), des structures telles que des viaducs ou des tunnels permettent également un meilleur flux génique entre des populations isolées (Lesbarrères et al. 2004, Woltz et al. 2008). Un de ces tunnels a d'ailleurs été aménagé le long de la route 220 près de Sherbrooke afin d'assurer une traverse sécuritaire aux amphibiens et reptiles qui fréquentent le marais du Lac Brompton avoisinant (Hamel & Mercier 2001). Or, ce type d'aménagement est peu applicable dans le cas du Mont-Royal, étant donné l'ampleur de la matrice urbaine qui sépare les populations. Le meilleur moyen de protection des salamandres du Mont-Royal semble donc être la conservation de leur habitat. Bien que la montagne soit classée depuis 2003 comme arrondissement historique et naturel par le gouvernement du Québec, elle fait toujours face à la menace de constructions domiciliaires. De plus, les 3 millions de visiteurs que reçoit annuellement le Parc du Mont-Royal contribuent à dégrader l'habitat forestier. Les randonnées et le vélo de montagne hors sentiers constituent en effet des activités incompatibles avec la préservation de l'habitat et qui devraient être bien encadrées.

## **6.2 Les salamandres cendrées de Montréal**

L'objectif du deuxième chapitre visait à étudier des populations de salamandres cendrées situées sur tout le territoire de Montréal. Pour ce faire, un effort d'échantillonnage important a été effectué. Les parcs-nature ont tout d'abord été ciblés en raison de leurs grands espaces verts protégés, et des populations de salamandres cendrées ont été retrouvées dans cinq d'entre eux. Afin d'augmenter le nombre de populations, l'échantillonnage a par la suite été étendu aux autres espaces forestiers, et un total de 10

populations ont été échantillonnées sur l'île, incluant les quatre du Mont-Royal. Des populations situées sur des îles adjacentes, soit l'Île-Bizard et l'Île-Perrot ont également été incluses dans l'étude. Il existe probablement d'autres populations sur l'île de Montréal dans des espaces verts qui n'ont pas été visités lors de la présente étude. Étant donné que la salamandre cendrée est une espèce exclusivement terrestre qui nécessite une forêt mature humide (Grover 1998, Hyde & Simons 2001), habitats peu communs sur l'île de Montréal, on peut raisonnablement estimer qu'une bonne partie des populations Montréalaises ont été échantillonnées. Les analyses effectuées avec six microsatellites montrent qu'il n'existe pas de forte structure génétique à l'intérieur de l'île de Montréal, bien que certaines populations du Mont-Royal soient différenciées en raison de leurs petites tailles efficaces et de leur longue histoire de perturbations anthropiques. De manière intéressante, les deux populations retrouvées sur des îles (Ile-Bizard et Ile-Perrot) forment un groupe distinct de celles retrouvées sur l'île de Montréal. Les îles semblent donc représenter un facteur d'isolement supérieur à la matrice urbaine. Un des volets de mon projet de doctorat initial consistait d'ailleurs à comparer les populations de salamandre cendrée de Montréal à celles de Laval et d'autres îles environnantes. Faute de temps, ce chapitre a malheureusement dû être abandonné. Des individus ont toutefois été récoltés sur trois îles de la Rivière-des-Mille-Îles, une île du Lac des Deux-Montagnes ainsi qu'à Laval.

### **6.3 Neutralité des microsatellites**

Le potentiel adaptatif d'une populations repose sur la présence de variation génétique pour des traits qui jouent un rôle écologique important, c'est-à-dire pour lesquels on peut observer des variations d'aptitude. Or, les analyses génétiques des chapitres 2 et 3 de ma thèse ont été réalisées à l'aide de microsatellites, soit des marqueurs neutres. On suppose généralement que la variabilité aux marqueurs neutres reflète de manière globale la variabilité génétique de l'ensemble du génome et donc le potentiel adaptatif (Soulé et al. 1973, O'Brien et al. 1985, Saccheri et al. 1998, Johansson et al. 2007). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré une corrélation entre la variabilité génétique neutre et phénotypique

(e.g. Briscoe et al. 1992, Soulé & Zegers 1996, Merila & Crnokrak 2001). D'autre part, la variabilité génétique évaluée à l'aide de marqueurs neutres n'est pas toujours corrélée à la diversité des traits quantitatifs à l'aptitude (Savolainen & Hedrick 1995, Booy et al. 2000, Knopp et al. 2007). La question de la relation entre la variabilité génétique neutre et adaptative n'est donc pas résolue.

Dans une perspective de conservation, il aurait pu être intéressant dans mon projet d'inclure également des marqueurs sous sélection. Par exemple, les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (major histocompatibility complex, MHC) jouent un rôle important dans la réponse immunitaire des vertébrés (Klein 1986, Piertney 2006) ainsi que dans la sélection sexuelle (Penn 2002, Milinski et al. 2005). L'analyse de ces gènes, ou encore de microsatellites situés à l'intérieur du MHC (Meagher & Potts 1997) pourrait donc être une mesure indirecte de l'aptitude des populations analysées.

D'autre part, il aurait également été intéressant d'évaluer sur le terrain certaines mesures de l'aptitude telles que la taille, la fécondité, le taux de survie, etc. Or, ceci dépasse largement le cadre de cette thèse qui se voulait une caractérisation génétique des populations.

## **6.4 Identification des salamandres unisexuées**

L'objectif du chapitre 4 était de développer une méthode moléculaire permettant de distinguer la salamandre à points bleus et la salamandre de Jefferson des salamandres unisexuées qui leur sont associées. Bien que les salamandres unisexuées soient généralement plus grandes et moins bleutées que les salamandres à points bleus, ces critères sont peu fiables et ne conviennent ni aux larves, ni aux juvéniles (Desroches & Rodrigue 2004). En janvier 2005, les seules méthodes disponibles pour distinguer les espèces bisexuées des unisexuées étaient les allozymes (Bogart 1982, Bogart et al. 1985), le nombre de chromosomes (Sessions 1982), la taille des érythrocytes (Uzzell 1964, Wilbur 1976,

Austin & Bogart 1982) et la quantité d'ADN (Lowcock et al. 1991). Or, toutes ces méthodes nécessitaient de sacrifier l'individu à identifier. Afin de pallier à cette situation, la méthode d'identification moléculaire présentée au chapitre 4 fut donc développée. Quelques mois plus tard, une autre méthode non invasive, celle-ci basée sur l'analyse des microsatellites, était publiée (Ramsden et al. 2006). En plus de distinguer les salamandres unisexuées des bisexuées, les microsatellites permettent également de connaître le génotype particulier d'un individu et d'acquérir de l'information sur la diversité génétique. La méthode que j'ai développée dans le cadre de ma thèse a toutefois l'avantage d'être plus rapide et économique lorsque seule la distinction entre les espèces pures (LL et JJ) et les unisexuées est requise. De plus, cette méthode pourrait être étendue aux autres espèces du complexe *Ambystoma*. Puisque toutes les salamandres unisexuées partagent un haplotype mitochondrial différent des quatre espèces bisexuées et semblable à celui de *A. barbouri*, il est fort probable que le fragment spécifique amplifié chez les unisexuées du complexe de Jefferson le serait également pour tous les génotypes du complexe *Ambystoma*. Cette hypothèse n'a toutefois pu être évaluée au cours de cette thèse en raison de l'absence d'échantillons dont les génotypes incluent le génome des deux autres espèces bisexuées du complexe, soit *A. texanum* (TT) et *A. tigrinum* (TiTi), deux espèces que l'on ne retrouve pas dans l'est du Canada.

## 6.5 Distribution des génotypes et urbanisation

Le chapitre 5 visait à obtenir de l'information sur la répartition géographique et la distribution de la variabilité génétique dans certaines populations du Québec. Bien que quelques échantillons québécois aient été inclus dans des études qui ciblaient surtout l'Ontario ou les États-Unis (Bogart & Klemens 2008, Bi et al. 2008), peu de données existaient au sujet des populations du Québec. Les analyses microsatellites réalisées au cours de mon doctorat indiquent que la fréquence des génotypes est extrêmement variable, certaines populations n'abritant pratiquement pas d'unisexuées alors que d'autres semblent en être exclusivement composées ou presque. Trois génotypes unisexués ont

été retrouvés au Québec, soit un diploïde (LJ), un triploïde (LLJ) et un tétraploïde (probablement LLLJ). La population du Mont St-Hilaire est particulière du fait qu'aucune salamandre à points bleus (LL) n'y a été répertoriée. Or, il est généralement admis que les femelles unisexuées sont dépendantes des mâles des espèces bisexuées pour la reproduction et sont donc toujours retrouvés en sympatrie (Bogart et al. 1989). Il est donc possible que des mâles LL soient présents dans la population en faible quantité et que l'effort d'échantillonnage ait été trop limité pour les détecter. En l'absence de mâles LL, il pourrait être possible que la salamandre maculée (*Ambystoma maculatum*) soit responsable de l'activation de l'embryogenèse. Or, cette situation n'a jamais été observée et la gynogenèse s'accomplit normalement à l'aide du sperme de l'une des quatre espèces bisexuées du complexe *Ambystoma*, dont la salamandre maculée ne fait pas partie. Finalement, cette population pourrait être parthénogénétique, c'est-à-dire que l'activation par le sperme ne serait pas nécessaire au développement de l'œuf. Dans le but d'éclaircir la situation ambiguë de la population d'unisexuées du Mont St-Hilaire, il serait donc intéressant de réaliser un échantillonnage exhaustif afin de s'assurer de l'absence de mâles LL.

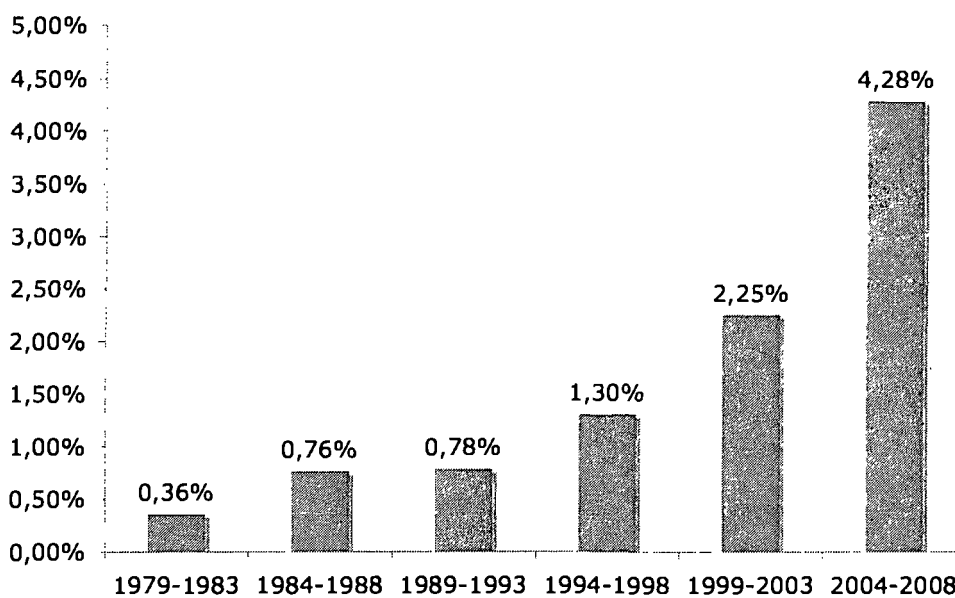
L'un des objectifs initiaux de ce volet de ma thèse consistait à évaluer l'effet de l'urbanisation sur la fréquence des génotypes et la diversité génétique des salamandres à points bleus. Or, le design expérimental de l'étude n'incluant qu'un seul site en milieu urbain n'était pas approprié pour étudier cette question. De plus, la population du Mont-Royal était majoritairement composée de triploïdes, et aucune autre population étudiée ne présentait une fréquence de génotypes semblable. La comparaison des valeurs de diversité génétique s'est donc avérée impossible puisque celles-ci sont extrêmement variables selon la présence de salamandres unisexuées diploïdes ou triploïdes et ne sont pas comparables entre génotypes. Les analyses ont néanmoins démontré que la population du Mont-Royal semble se démarquer de celle en milieu protégé en raison de sa fréquence élevée d'unisexuées et de sa faible diversité génétique. Il serait intéressant de poursuivre les recherches entreprises en incluant d'autres sites en milieu urbain.

## 6.6 La conservation en milieu urbain

L'urbanisation présente de telles menaces à la protection de la biodiversité qu'il devrait s'agir d'un enjeu central en biologie de la conservation (Pickett et al. 1992). Or, une minorité d'études sont effectuées près ou dans les villes. Afin d'évaluer l'intérêt des chercheurs pour la conservation en milieu urbain, j'ai analysé les articles parus dans les deux principaux périodiques en biologie de la conservation (*Biological Conservation* et *Conservation Biology*) depuis les 30 dernières années. Après avoir divisé cette période par tranche de cinq années, j'y ai répertorié la proportion d'articles où le mot *urban* était indexé dans les sujets. Pour la période de 1979 à 1983, un maigre 0,36% des études traitaient du milieu urbain (Figure 6.1). Cette proportion a toutefois augmenté constamment au fil des ans et c'est aujourd'hui un peu plus de 4% des articles, soit 10 fois plus, qui sont dévolus à ce sujet.

Ce pourcentage demeure toutefois relativement faible et l'on peut s'interroger sur les causes qui poussent les biologistes à choisir d'autres terrains d'études. La biodiversité des milieux naturels situés hors des centres urbains est certainement supérieure à celle des villes. Il y est également plus facile de mettre en œuvre des projets de conservation et d'établir des aires protégées là où les perturbations anthropiques sont réduites. De plus, la préservation d'aires naturelles à l'intérieur des villes fait face à d'importantes pressions de développement et d'intérêts politiques. Sans compter que les territoires sauvages des régions tropicales possèdent un capital d'exotisme incomparable! Il n'en reste pas moins que l'accroissement de la population et la tendance mondiale à l'urbanisation nécessite un changement de paradigme. Je suis donc confiante que l'écologie urbaine saura trouver sa place au sein de la biologie de la conservation dans ce monde de plus en plus urbanisé.





**Figure 6.1** Évolution de la proportion d'articles publiés dans *Biological Conservation* et *Conservation Biology* où le mot *urban* était indexé dans les mots-clés pour les années 1979 à 2008.

## Bibliographie

- Acevedo-Whitehouse K, Cunningham AA (2006) Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 433-438.
- Adams FD (1903) The Montereian hills: a Canadian petrographical province. *Journal of Geology* **2**, 239-282.
- Alford RA, Richards SJ (1999) Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**, 133-165.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 613-622.
- Alves MJ, Coelho MM, Collares-Pereira MJ (2001) Evolution in action through hybridisation and polyploidy in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica* **111**, 375-385.
- AmphibiaWeb (2009) Information on amphibian biology and conservation. <http://amphibiaweb.org>.
- Andersen LW, Fog K, Damgaard C (2004) Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* **271**, 1293-1302.
- Arens P, van der Sluis T, van't Westende WPC, Vosman B, Vos CC, Smulders MJM (2007) Genetic population differentiation and connectivity among fragmented Moor frog (*Rana arvalis*) populations in The Netherlands. *Landscape Ecology* **22**, 1489-1500.
- Austin NE, Bogart JP (1982) Erythrocyte area and ploidy determination in the salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex. *Copeia* **1982**, 485-488.
- Avise JC, Lansman RA, Shade RO (1979) The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics* **92**, 279-295.
- Barinaga M (1990) Where have all the froggies gone? *Science* **247**, 1033-1034.
- Barton NH, Charlesworth B (1998) Why sex and recombination? *Science* **281**, 1986-1990.

- Bazar MA, Quinn MJ, Mozzachio K, Johnson MS (2008) Toxicological responses of red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*) to subchronic soil exposures of 2,4,6-trinitrotoluene. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**, 1393-1398.
- Beck NR, Double MC, Cockburn A (2003) Microsatellite evolution at two hypervariable loci revealed by extensive avian pedigrees. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 54-61.
- Beckmann JS, Weber JL (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* **12**, 627-631.
- Beebee TJC (1973) Observations concerning the decline of the British amphibia. *Biological Conservation* **5**, 20-24.
- Beebee TJC, Flower RJ, Stevenson aC, Patrick ST, Appleby PG, Fletcher C, Marsh C, Natkanski J, Rippey B, Battarbee RW (1990) Decline of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: paleoecological, documentary and experimental evidence for breeding site acidification. *Biological Conservation* **53**, 1-20.
- Beier P, Noss RF (1998) Do habitat corridors provide connectivity? *Conservation Biology* **12**, 1241-1252.
- Belloq MI, Kloosterman K, Smith SM (2000) The diet of coexisting species of amphibians in Canadian jack pine forests. *Herpetological Journal* **10**, 63-68.
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9031-9036.
- Bernatchez L (1997) Mitochondrial DNA analysis confirms the existence of two glacial races of rainbow smelt *Osmerus mordax* and their reproductive isolation in the St Lawrence River estuary (Quebec, Canada). *Molecular Ecology* **6**, 73-83.
- Berry O, Tocher MD, Sarre SD (2004) Can assignment tests measure dispersal? *Molecular Ecology* **13**, 551-561.

- Bi K, Bogart JP, Fu JZ (2008) The prevalence of genome replacement in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* (Amphibia, Caudata) revealed by nuclear gene genealogy. *BMC Evolutionary Biology* **8**.
- Bijlsma-Meeles E, Van Delden W (1974) Intra- and interpopulation selection concerning the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **247**, 369-371.
- Binet MC, Angers B (2005) Genetic identification of members of the *Phoxinus eos-neogaeus* hybrid complex. *Journal of Fish Biology* **67**, 1169-1177.
- Blaustein AR, Kiesecker JM, Chivers DP, Hokit DG, Marco A, Belden LK, Hatch A (1998) Effects of ultraviolet radiation on amphibians: field experiments *American Zoologist* **38**, 799-812.
- Blaustein AR, Wake DB (1990) Declining amphibian populations : a global phenomenon. *Trends in Ecology and Evolution* **5**, 203-204.
- Bogart JP (1982) Ploidy and genetic diversity in Ontario salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex revealed through an electrophoretic examination of larvae. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **60**, 848-855.
- Bogart JP (2003) Genetics and systematics of hybrid species. Dans: *Reproductive biology and phylogeny of Urodela* (ed. Sever DM). Science publishers, Inc., Enfield.
- Bogart JP, Bi K, Fu JZ, Noble DWA, Niedzwiecki J (2007) Unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) present a new reproductive mode for eukaryotes. *Genome* **50**, 119-136.
- Bogart JP, Elinson RP, Licht LE (1989) Temperature and sperm incorporation in polyploid salamanders. *Science* **246**, 1032-1034.
- Bogart JP, Klemens MW (1997) Hybrids and genetic interactions of mole salamanders (*Ambystoma jeffersonianum* and *A. laterale*) (Amphibia: Caudata) in New York and New England. *American Museum Novitates* **3218**, 1-78.
- Bogart JP, Klemens MW (2008) Additional distributional records of *Ambystoma laterale*, *A. jeffersonianum* (Amphibia: Caudata) and their unisexual kleptogens in northeastern North America. *American Museum Novitates*, 1-58.
- Bogart JP, Licht LE, Oldham MJ, Darbyshire SJ (1985) Electrophoretic identification of *Ambystoma laterale* and *Ambystoma texanum* as well as their diploid and triploid

- interspecific hybrids (Amphibia, Caudata) on Pelee island, Ontario. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **63**, 340-347.
- Bonin J, Desroches J-F, Ouellet M, Leduc A (1999) Les forêts anciennes: refuges pour les salamandres. *Naturaliste canadien* **123**, 13-18.
- Booy G, Hendriks RJJ, Smulders MJM, Van Groenendael JM, Vosman B (2000) Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biology* **2**, 379-395.
- Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Huhne J, Rolf B (1998) Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *American Journal of Human Genetics* **62**, 1408-1415.
- Briscoe DA, Malpica JM, Robertson A, Smith GJ, Frankham R, Banks RG, Barker JSF (1992) Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies implications for the genetic management of captive populations. *Conservation Biology* **6**, 416-425.
- Brohede J, Primmer CR, Moller A, Ellegren H (2002) Heterogeneity in the rate and pattern of germline mutation at individual microsatellite loci. *Nucleic Acids Research* **30**, 1997-2003.
- Brown JL (1965) Stability of color phase ratio in populations of *Plethodon cinereus*. *Copeia* **1965**, 95-98.
- Buri P (1956) Gene frequency in small populations of mutant *Drosophila*. *Evolution* **10**, 367-402.
- Burrowes PA, Joglar RL, Green DE (2004) Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica* **60**, 141-154.
- Burton TM, Likens GE (1975) Salamander populations and biomass in the Hubbard brook experimental forest, New Hampshire. *Copeia* **1975**, 541-546.
- Cabe PR, Page RB, Hanlon TJ, Aldrich ME, Connors L, Marsh DM (2007) Fine-scale population differentiation and gene flow in a terrestrial salamander (*Plethodon cinereus*) living in continuous habitat. *Heredity* **98**, 53-60.
- Caldwell RS (1975) Observations on the winter activity of the red-backed salamander, *Plethodon cinereus*, in Indiana. *Herpetologica* **31**, 21-22.

- Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ (1999) HLA and HIV-1: Heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science* **283**, 1748-1752.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetics analysis: models and estimation procedures. *Evolution* **21**, 550-570.
- Cavayas F, Baudouin Y (2008) Évolution des occupations du sol, du couvert végétal et des îlots de chaleur sur le territoire de la Communauté métropolitaine de Montréal (1984-2005). Université du Québec à Montréal, Montréal.
- Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R (1997) Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1041-1046.
- Chiesura A (2004) The role of urban parks for the sustainable city. *Landscape and Urban Planning* **68**, 129-138.
- Cincotta RP, Engelman R (2000) Nature's place: Human population and the future of biological diversity (ed. International PA), Washington, D.C.
- Cohen B (2006) Urbanization in developing countries: Current trends, future projections, and key challenges for sustainability. *Technology in Society* **28**, 63-80.
- Collins JP, Storfer A (2003) Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* **9**, 89-98.
- Comeau NM (1943) Une ambystome nouvelle. *Annales de l'ACFAS* **9**, 124-125.
- Conant R, Collins JT (1998) *A field guide to reptiles and amphibians of eastern and central North America*. Houghton Mifflin, Boston.
- Conner JK, Hartl DL (2004) *A primer of ecological genetics*. Sinauer, Sunderland.
- Connors LM, Cabe PR (2003) Isolation of dinucleotide microsatellite loci from red-backed salamander (*Plethodon cinereus*). *Molecular Ecology Notes* **3**, 131-133.
- Cope ED (1867) A review of the species of the Ambystomatidae. *Proceedings of the Academy of the Natural Sciences of Philadelphia* **19**, 166-211.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.

- COSEWIC (2000) COSEWIC assessment and status report on the Jefferson salamander *Ambystoma jeffersonianum* in Canada. (ed. COSEWIC), Ottawa.
- Crnokrak P, Barrett SCH, Mitton J (2002) Perspective: purging the genetic load: a review of the experimental evidence. *Evolution* **56**, 2347-2358.
- Crow JF (1994) Advantages of sexual reproduction. *Developmental Genetics* **15**, 205-213.
- Crow JF, Kimura M (1970) *An introduction to population genetics theory*. Harper & Row, New York.
- Czech B, Krausman PR, Devers PK (2000) Economic associations among causes of species endangerment in the United States. *Bioscience* **50**, 593-601.
- David P (1998) Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity* **80**, 531-537.
- Dawley EM (1992) Sexual dimorphism in a chemosensory system : the role of the vomeronasal organ in salamander reproductive behavior. *Copeia*, 113-120.
- Dawley RM (1989) An introduction to unisexual vertebrates. Dans: *Evolution and ecology of unisexual vertebrates* (eds. Dawley RM, Bogart JP), pp. 1-17. New York State Museum, Albany.
- Delmotte F, Leterme N, Gauthier JP, Rispe C, Simon JC (2002) Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**, 711-723.
- deMaynadier PG, Hunter ML (1998) Effects of silvicultural edges on the distribution and abundance of amphibians in Maine. *Conservation Biology* **12**, 340-352.
- DeSalle R, Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* **5**, 702-712.
- Desroches J-F, Rodrigue D (2004) *Amphibiens et reptiles du Québec et des Maritimes*. Michel Quintin, Waterloo.
- DeWoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* **56**, 461-473.

- Dieringer D, Schlötterer C (2003) Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* **3**, 167-169.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3166-3170.
- Dodd CK, Smith LL (2003) Habitat destruction and alteration: historical trends and future prospects for amphibians. Dans: *Amphibian conservation* (ed. Semlitsch RD), pp. 94-112. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Ducey PK, Schramm K, Cambry N (1994) Interspecific aggression between the sympatric salamanders, *Ambystoma maculatum* and *Plethodon cinereus*. *American Midland Naturalist* **131**, 320-329.
- Duh JD, Shandas V, Chang HJ, George LA (2008) Rates of urbanisation and the resiliency of air and water quality. *Science of the total environment* **400**, 238-256.
- Dyrkacz S (1981) Recent instances of albinism in North American amphibians and reptiles. *Society for the study of amphibians and reptiles, Herpetological circular no. 11*.
- Edwards YJK, Elgar G, Clark MS, Bishop MJ (1998) The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *Journal of Molecular Biology* **278**, 843-854.
- Ehman H, Cogger H (1985) Australia's endangered herpetofauna: a review of criteria and policies. Dans: *Biology of Australasian frogs and reptiles* (eds. Grigg GC, Shine R, Ehmann HFW), pp. 435-447. Surrey Beatty and Sons, Sydney.
- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* **16**, 551-558.
- Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* **5**, 435-445.



- Elzanowski A, Ciesiolkiewicz J, Kaczor M, Radwanska J, Urban R (2009) Amphibian road mortality in Europe: a meta-analysis with new data from Poland. *European Journal of Wildlife Research* **55**, 33-43.
- Estoup A, Largiader CR, Perrot E, Chourrout D (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5**, 295-298.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA Haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**, 487-515.
- Fahrig L, Pedlar JH, Pope SE, Taylor PD, Wegner JF (1995) Effect of road traffic on amphibian density. *Biological Conservation* **73**, 177-182.
- Falconer DS (1981) *Introduction to quantitative genetics*. Longman, Harlow.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data : linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587.
- Felsenstein J (1993) PHYLIP, version 3.5c. <http://evolution.genetics.washington.edu>. .
- Fernandez-Juricic E, Jokimaki J (2001) A habitat island approach to conserving birds in urban landscapes : case studies from southern and northern Europe. *Biodiversity and Conservation* **10**, 2023-2043.
- Field SG, Lange M, Schulenburg H, Velavan TP, Michiels NK (2007) Genetic diversity and parasite defense in a fragmented urban metapopulation of earthworms. *Animal Conservation* **10**, 162-175.
- Fitzsimmons NN (1998) Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology* **7**, 575-584.
- Fitzsimmons NN, Moritz C, Moore SS (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 432-440.

- Forman RTT (1995) *Land mosaics: the ecology of landscapes and regions*. Cambridge University, Cambridge.
- Forman RTT, Alexander LE (1998) Roads and their major ecological effects. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 207-231.
- Frankel OH (1974) Genetic conservation: our evolutionary responsibility. *Genetics* **78**, 53-65.
- Frankel OH, Soulé ME (1981) *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R (1995) Inbreeding and extinction : a threshold effect. *Conservation Biology* **9**, 792-799.
- Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* **10**, 1500-1508.
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation* **126**, 131-140.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frisbie MP, Wyman RL (1995) A field simulation of the effect of acidic rain on ion balance in a woodland salamander. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **28**, 327-333.
- Gardner MG, Bull CM, Cooper SJB, Duffield GA (2000) Microsatellite mutations in litters of the Australian lizard *Egernia stokesii*. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 551-560.
- Garza JC, Slatkin M, Freimer NB (1995) Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 594-603.
- Gibbs JP (1998a) Genetic structure of redback salamander *Plethodon cinereus* populations in continuous and fragmented forests. *Biological Conservation* **86**, 77-81.
- Gibbs JP (1998b) Amphibian movements in response to forest edges, roads, and streambeds in southern New England. *Journal of Wildlife Management* **62**, 584-589.

- Gibbs JP (1998c) Distribution of woodland amphibians along a forest fragmentation gradient. *Landscape Ecology* **13**, 263-268.
- Gill DE (1978) The metapopulation ecology of the red-spotted newt, *Notopthalmus viridescens* (Rafinesque). *Ecological Monographs* **48**, 145-166.
- Goudet J (2002) FSTAT, a software to estimate and test gene diversities and differentiation statistics from codominant markers (version 2.9.3.2). <http://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>
- Green DM (1997) Perspectives on amphibian population declines: defining the problem and searching for answers. *Herpetological Conservation* **1**, 291-308.
- Greer AEJ (1973) Adaptive significance of the color phases of the red-backed salamander. *Year-book of the American Philosophical Society* **1973**, 308-309.
- Griffiths R, Beebee T (1992) Decline and fall of the amphibians. *New Scientist* **134**, 25-29.
- Groombridge JJ, Jones CG, Bruford MW, Nichols RA (2000) Conservation biology : "Ghost" alleles of the Mauritius kestrel. *Nature* **403**, 616-616.
- Grover MC (1998) Influence of cover and moisture on abundances of the terrestrial salamanders *Plethodon cinereus* and *Plethodon glutinosus*. *Journal of Herpetology* **32**, 489-497.
- Halkett F, Simon JC, Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 194-201.
- Halliburton R (2004) *Introduction to population genetics*. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T (1982) A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 6465-6469.
- Hamel J-F, Mercier A (2001) La traverse pour amphibiens, un moyen de préservation de la vitalité des marais. *Naturaliste Canadien* **125**, 72-74.
- Hamer AJ, McDonnell MJ (2008) Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: a review. *Biological Conservation* **141**, 2432-2449.

- Hancock JM (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. Dans: *Microsatellites: evolution and adaptation* (eds. Goldstein DB, Schlötterer C), pp. 1-9. Oxford University Press, Oxford.
- Hanski I (1999) *Metapopulation ecology*. Oxford University Press, New York.
- Hanski I, Pakkala T, Kuussaari M, Lei GC (1995) Metapopulation persistence of an endangered butterfly in a fragmented landscape. *Oikos* **72**, 21-28.
- Harr B, Schlötterer C (2000) Long microsatellite alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genome-wide underrepresentation. *Genetics* **155**, 1213-1220.
- Hartl DL (1980) *Principles of population genetics*. Sinauer, Sunderland.
- Hayes MP, Jennings MR (1986) Decline of ranid frog species in western North America : are bullfrogs (*Rana catesbeiana*) responsible? *Journal of Herpetology* **20**, 490-509.
- Hecnar SJ, McLoskey RT (1996) Regional dynamics and the status of amphibians. *Ecology* **77**, 2091-2097.
- Hedges SB, Bogart JP, Maxson LR (1992) Ancestry of unisexual salamanders. *Nature* **356**, 708-710.
- Hedrick PW, Ginevan ME, Ewing EP (1976) Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Annual Review of Ecology and Systematics* **7**, 1-32.
- Hermý M, Cornelis J (2000) Towards a monitoring method and a number of multifaceted and hierarchical biodiversity indicators for urban and suburban parks. *Landscape and Urban Planning* **49**, 149-162.
- Highton R (1959) The inheritance of the color phases of *Plethodon cinereus*. *Copeia* **1959**, 33-37.
- Highton R (1975) Geographic variation in genetic dominance of the color morphs of the red-backed salamander, *Plethodon cinereus*. *Genetics* **80**, 363-374.
- Highton R (1977) Comparison of microgeographic variation in morphological and electrophoretic traits. Dans: *Evolutionary biology* (eds. Hecht M, Steer W, Wallace B). Plenum, New York.

- Highton R, Larson a (1979) Genetic relationships of the salamanders of the genus *Plethodon*. *Systematic Zoology* **28**, 579-599.
- Highton R, Webster TP (1976) Geographic protein variation and divergence in populations of the salamander *Plethodon cinereus*. *Evolution* **30**, 33-45.
- Hilty JA, Lidicker WZJ, Merenlender AM (2006) *Corridor ecology : the science and practice of linking landscapes for biodiversity conservation*. Island Press, Washington, DC.
- Hitchings SP, Beebee TJC (1997) Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations : implications for biodiversity conservation. *Heredity* **79**, 117-127.
- Hitchings SP, Beebee TJC (1998) Loss of genetic diversity and fitness in common toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. *Journal of Evolutionary Biology* **11**, 269-283.
- Houlahan JE, Findlay CS, Schmidt BR, Meyer AH, Kuzmin SL (2000) Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* **404**, 752-755.
- Howell AB (1933) The involved genetics of fish. *Science* **77**, 389-390.
- Hua LJ, Ma ZG, Guo WD (2008) The impact of urbanization on air temperature across China. *Theoretical and Applied Climatology* **93**, 179-194.
- Huang QY, Xu FH, Shen H, Deng HY, Liu YJ, Liu YZ, Li JL, Recker RR, Deng HW (2002) Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *American Journal of Human Genetics* **70**, 625-634.
- Hubbs CL, Hubbs LC (1932) Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish hybrid origin. *Science* **76**, 628-630.
- Hubby JL, Lewontin RC (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**, 577-594.
- Hyde EJ, Simons TR (2001) Sampling plethodontid salamanders: sources of variability. *Journal of Wildlife Management* **65**, 624-632.

- Irwin EG, Bockstael NE (2007) The evolution of urban sprawl: evidence of spatial heterogeneity and increasing land fragmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 20672-20677.
- Jaeger RG (1979) Seasonal spatial distributions of the terrestrial salamander *Plethodon cinereus*. *Herpetologica* **35**, 90-93.
- Jaeger RG (1981) Dear enemy recognition and the costs of aggression between salamanders. *American Naturalist* **117**, 962-974.
- Jimenez JA, Hughes KA, Alaks G, Graham L, Lacy RC (1994) An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* **266**, 271-273.
- Johansson M, Primmer CR, Merila J (2007) Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology* **16**, 2693-2700.
- Jones CG, Heck W, Lewis RE, Mungroo Y, Slade G, Cade T (1994) The restoration of the Mauritius kestrel *Falco punctatus* populations. *Ibis* **137**, S173-S180.
- Julian SE, King TL, Savage WK (2003) Novel Jefferson salamander, *Ambystoma jeffersonianum*, microsatellite DNA markers detect population structure and hybrid complexes. *Molecular Ecology Notes* **3**, 95-97.
- Karns DR (1992) Effects of acidic bog habitats on amphibian reproduction in a northern Minnesota peatland. *Journal of Herpetology* **26**, 401-412.
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 230-241.
- Kiesecker JM, Blaustein AR (1995) Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 11049-11052.
- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**, 725-738.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 2868-2872.

- Kleeberger SR, Werner JK (1982) Home range and homing behavior of *Plethodon cinereus* in northern Michigan. *Copeia*, 409-415.
- Klein HG (1960) Population estimate of the red-backed salamander. *Herpetologica* **16**, 52-54.
- Klein J (1986) *The natural history of the major histocompatibility complex*. Wiley & Sons, New York.
- Knapp RA, Matthews KR (2000) Non-native fish introductions and the decline of the mountain yellow-legged frog from within protected areas. *Conservation Biology* **14**, 428-438.
- Knopp T, Cano JM, Crochet PA, Merila J (2007) Contrasting levels of variation in neutral and quantitative genetic loci on island populations of moor frogs (*Rana arvalis*). *Conservation Genetics* **8**, 45-56.
- Kobayashi H (1971) A cytological study on gynogenesis of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*). *Zoological Magazine* **80**, 316-322.
- Kolozsvary MB, Swihart RK (1999) Habitat fragmentation and the distribution of amphibians: patch and landscape correlates in farmland. *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie* **77**, 1288-1299.
- Kreitman M (1983) Nucleotide Polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **304**, 412-417.
- Kruuk LEB, Sheldon BC, Merila J (2002) Severe inbreeding depression in collared flycatchers (*Ficedula albicollis*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **269**, 1581-1589.
- Kucken DJ, Davis JS, Petranka JW, Smith CK (1994) Anakeesta stream acidification and metal contamination : effects on a salamander community. *Journal of Environmental Quality* **23**, 1311-1317.
- Kuhn J (1987) Strabentod der Erdkröte (*Bufo bufo* L.) Verlustquoten und Verkehrsaufkommen, Verhalten auf der Straße. *Beiheft Veröffentlichungen Naturschutz Landschaftspflege Baden-Württemberg* **41**, 175-176.

- Lacy R (1987) Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology* **1**, 143-158.
- Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research* **21**, 1111-1115.
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science* **241**, 1455-1460.
- Landry M (1999) Le mont Royal : le monument naturel de Montréal. Centre de la montagne, Montréal.
- Langen TA, Ogden KM, Schwarting LL (2009) Predicting hot spots of herpetofauna road mortality along highway networks. *Journal of Wildlife Management* **73**, 104-114.
- Larson A, Wake DB, Yanev KP (1984) Measuring gene flow among populations having high-levels of genetic fragmentation. *Genetics* **106**, 293-308.
- Legendre P, Lapointe FJ, Casgrain P (1994) Modeling brain evolution from behavior : a permutational regression approach. *Evolution* **48**, 1487-1499.
- Lesbarrères D, Lode T, Merila J (2004) What type of amphibian tunnel could reduce road kills? *Oryx* **38**, 220-223.
- Levins R (1970) Extinction. Dans: *Some mathematical problems in biology* (ed. Gesternhaber M), pp. 77-107. American Mathematical Society, Providence.
- Levinson G, Gutman Ga (1987) Slipped-strand mispairing : a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 203-221.
- Leviton AE, Gibbs RHJ, Heal E, Dawson CE (1985) Standards in herpetology and ichthyology: part I. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology. *Copeia* **1985**, 802-832.
- Lewis PO, Zaykin D (2001) Genetic Data Analysis (GDA): Computer program for the analysis of allelic data. <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>



- Lewontin RC, Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**, 595-609.
- Licht LE (1989) Reproductive parameters of unisexual *Ambystoma* on Pelee island, Ontario. Dans: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* (eds. Dawley RM, Bogart JP), pp. 209-217. New York State Museum, Albany.
- Lin CY, Chen WC, Liu SC, Liou YA, Liu GR, Lin TH (2008) Numerical study of the impact of urbanization on the precipitation over Taiwan. *Atmospheric Environment* **42**, 2934-2947.
- Lin YS, Poh YP, Lin SM, Tzeng CS (2002) Molecular techniques to identify freshwater eels: RFLP analyses of PCR-amplified DNA fragments and allele-specific PCR from mitochondrial DNA. *Zoological Studies* **41**, 421-430.
- Lindsay L (2004) Green space acquisition and stewardship in Canada's urban municipalities (ed. Evergreen), Toronto.
- Linteau P-A (2000) *Histoire de Montréal depuis la confédération*. Boréal, Montréal.
- Lips KR (1998) Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* **12**, 106-117.
- Litt M, Luty Ja (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* **44**, 397-401.
- Lotter F, Scott NJJ (1977) Correlation between climate and distribution of the color morphs of the salamander *Plethodon cinereus*. *Copeia* **1977**, 681-690.
- Lowcock LA (1994) Biotype, genomotype, and genotype : variable effects of polyploidy and hybridity on ecological partitioning in a bisexual-unisexual community of salamanders. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **72**, 104-117.
- Lowcock LA, Griffith H (1991) The *Ambystoma laterale-jeffersonianum* complex in central Ontario : ploidy structure, sex-ratio, and breeding dynamics in a bisexual-unisexual community. *Copeia*, 87-105.

- Lowcock LA, Licht LE, Bogart JP (1987) Nomenclature in hybrid complexes of *Ambystoma* (Urodela, Ambystomatidae) : no case for the erection of hybrid species. *Systematic Zoology* **36**, 328-336.
- Lynch M, Walsh B (1998) *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer, Sunderland.
- Magoulas A, Kotoulas G, Gerard A, Naciri-Graven Y, Dermitzakis E, Hawkins AJS, Li A (2000) Comparison of genetic variability and parentage in different ploidy classes of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics Research* **76**, 261-272.
- Mandrak NE, Crossman EJ (1992) Postglacial dispersal of fresh-water fishes into Ontario. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **70**, 2247-2259.
- Manni F, Guerard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology* **76**, 173-190.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**, 209-220.
- Marsh DM, Beckman NG (2004) Effects of forest roads on the abundance and activity of terrestrial salamanders. *Ecological Applications* **14**, 1882-1891.
- Marsh DM, Milam GS, Gorham NR, Beckman NG (2005) Forest roads as partial barriers to terrestrial salamander movement. *Conservation Biology* **19**, 2004-2008.
- Marsh DM, Page RB, Hanlon TJ, Bareke H, Corritone R, Jetter N, Beckman NG, Gardner K, Seifert DE, Cabe PR (2007) Ecological and genetic evidence that low-order streams inhibit dispersal by red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie* **85**, 319-327.
- Marsh DM, Page RB, Hanlon TJ, Corritone R, Little EC, Seifert DE, Cabe PR (2008) Effects of roads on patterns of genetic differentiation in red-backed salamanders, *Plethodon cinereus*. *Conservation Genetics* **9**, 603-613.
- Marsh DM, Thakur KA, Bulka KC, Clarke LB (2004) Dispersal and colonization through open fields by a terrestrial, woodland salamander. *Ecology* **85**, 3396-3405.

- Marshall DR, Brown AHD (1975) Optimum sampling strategies in genetic conservation. Dans: *Crop genetic resources for today and tomorrow* (eds. Frankel OH, Hawkes JG), pp. 53-80. Cambridge University Press, Cambridge.
- Martinez-Solano I, Lawson R (2009) Escape to Alcatraz: evolutionary history of slender salamanders (*Batrachoseps*) on the islands of San Francisco Bay. *BMC Evolutionary Biology* **9**.
- Massicotte D (1999) Dynamique de croissance et de changement à Montréal de 1792 à 1819: le passage de la ville préindustrielle à la ville industrielle. *Urban History Review* **28**, 14-30.
- Masters BS, Forester DC (1995) Kin recognition in a brooding salamander. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* **261**, 43-48.
- Mathis A (1990) Territorial salamanders assess sexual and competitive information using chemical signals. *Animal Behaviour* **40**, 953-962.
- Mathis A (1991) Territories of male and female terrestrial salamanders : costs, benefits, and intersexual spatial associations. *Oecologia* **86**, 433-440.
- Maxson LR, Highton R, Wake DB (1979) Albumin evolution and its phylogenetic implications in the Plethodontid salamander genera *Plethodon* and *Ensatina*. *Copeia*, 502-508.
- Mayr E (1963) *Animal species and evolution*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Mazerolle MJ (2004) Amphibian road mortality in response to nightly variations in traffic intensity. *Herpetologica* **60**, 45-53.
- McKinney ML (2002) Influence of settlement time, human population, park shape and age, visitation and roads on the number of alien plant species in protected areas in the USA. *Diversity and Distributions* **8**, 311-318.
- McKinney ML (2006) Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biological Conservation* **127**, 247-260.

- McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB (1990) *Conserving the world's biological diversity*. International Union for the Conservation of Nature, Gland.
- Meagher S, Potts WK (1997) A microsatellite-based MHC genotyping system for house mice (*Mus domesticus*), 75-82.
- Measey GJ, Vences M, Drewes RC, Chiari Y, Melo M, Bourles B (2007) Freshwater paths across the ocean: molecular phylogeny of the frog *Ptychadena newtoni* gives insights into amphibian colonization of oceanic islands. *Journal of Biogeography* **34**, 7-20.
- Meffe G, Carroll CR (1997) *Principles of conservation biology*. Sinauer, Sunderland.
- Menken SBJ, Smit E, den Nijs HCM (1995) Genetical population structure in plants: gene flow between diploid sexual and triploid asexual dandelions (*Taraxacum* section *Ruderalia*). *Evolution* **49**, 1108-1118.
- Merila J, Crnokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 892-903.
- Meyer A, Zardoya R (2003) Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**, 311-338.
- Milinski M, Griffiths S, Wegner KM, Reusch TBH, Haas-Assenbaum A, Boehm T (2005) Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4414-4418.
- Miller JR, Hobbs RJ (2002) Conservation where people live and work. *Conservation Biology* **16**, 330-337.
- Milligan BG, Leebensmack J, Strand AE (1994) Conservation genetics : beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology* **3**, 423-435.
- Molina MJ, Molina LT (2004) Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association* **54**, 644-680.
- Monmonier M (1973) Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis* **3**, 245-261.

- Morin PA, Luikart G, Wayne RK (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 208-216.
- Morris MA, Brandon RA (1984) Gynogenesis and hybridization between *Ambystoma platineum* and *Ambystoma texanum* in Illinois. *Copeia*, 324-337.
- Moyle PB (1973) Effects of introduced bullfrogs, *Rana catesbeiana*, on the native frogs of the San Joaquin valley, California. *Copeia* **1973**.
- Mueller RL, Macey JR, Jaekel M, Wake DB, Boore JL (2004) Morphological homoplasy, life history evolution, and historical biogeography of plethodontid salamanders inferred from complete mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13820-13825.
- Muller HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* **1**, 2-9.
- Mullis KB, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**.
- Murdoch MH, Hebert PDN (1997) Mitochondrial DNA evidence of distinct glacial refugia for brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) in the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 1450-1460.
- Murphy NR, Hellwig RJ (1996) Improved nucleic acid organic extraction through use of a unique gel barrier material. *Biotechniques* **21**, 934 ff.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853-858.
- NatureServe (2009) A network connecting science with conservation. <http://www.natureserve.org>.
- Neel MC (2008) Patch connectivity and genetic diversity conservation in the federally endangered and narrowly endemic plant species *Astragalms albens* (Fabaceae). *Biological Conservation* **141**, 938-955.
- Nelson DL (1993) Six human genetic disorders involving mutant trinucleotide repeats. Dans: *Genome analysis vol 7: Genome rearrangement and stability* (eds. Davies KE, Warren ST). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.

- Nicoll MAC, Jones CG, Norris K (2004) Comparison of survival rates of captive-reared and wild-bred Mauritius kestrels (*Falco punctatus*) in a re-introduced population. *Biological Conservation* **118**, 539-548.
- Noël S, Angers B, Lapointe FJ (2005) *Peromyscus* populations and their *Cuterebra* parasites display congruent phylogeographical structure. *Parasitology* **131**, 237-245.
- Noël S, Dumoulin J, Ouellet M, Galois P, Lapointe FJ (2008) Rapid identification of salamanders from the Jefferson complex with taxon-specific primers. *Copeia* **2008**, 158-161.
- Noël S, Ouellet M, Galois P, Lapointe FJ (2007) Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conservation Genetics* **8**, 599-606.
- Noël S, Tessier N, Angers B, Wood DM, Lapointe FJ (2004) Molecular identification of two species of myiasis-causing *Cuterebra* by multiplex PCR and RFLP. *Medical & Veterinary Entomology* **18**, 161-166.
- Noss RF (1990) Indicators for monitoring biodiversity : a hierarchical approach. *Conservation Biology* **4**, 355-364.
- O'Brien SJ, Roelke ME, Marker L, Newman A, Winkler CA, Meltzer D, Colly L, Evermann JF, Bush M, Wildt DE (1985) Genetic basis for species vulnerability in the Cheetah. *Science* **227**, 1428-1434.
- Olsen JB, Wenburg JK, Bentzen P (1996) Semiautomated multilocus genotyping of Pacific salmon (*Oncorhynchus sp.*) using microsatellites. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5**, 259-272.
- Onodera S, Saito M, Sawano M, Hosono T, Taniguchi M, Shimada J, Umezawa Y, Lubis RF, Buapeng S, Delinom R (2008) Effects of intensive urbanization on the intrusion of shallow groundwater into deep groundwater: examples from Bangkok and Jakarta. *Science of the total environment* **404**, 401-410.

- Ouellet M, Galois P, Pétel R (2004) Inventaire des amphibiens et des reptiles sur le mont royal au cours de l'année 2004. Direction des sports, des parcs et des espaces verts de la Ville de Montréal, Montréal.
- Ouellet M, Galois P, Pétel R, Fortin C (2005) Les amphibiens et les reptiles des collines montréalaises: enjeux et conservation. *Naturaliste canadien* **129**(1), 42-49.
- Ouellet M, Mikaelian I, Pauli BD, Rodrigue J, Green DM (2005) Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conservation Biology* **19**, 1431-1440.
- Pabijan M, Babik W, Rafinski J (2005) Conservation units in north-eastern populations of the Alpine newt (*Triturus alpestris*). *Conservation Genetics* **6**, 307-312.
- Packer C, Gilbert Da, Pusey aE, O'Brien SJ (1991) A molecular genetic analysis of kinship and cooperation in African lions. *Nature* **351**, 562-565.
- Paul MJ, Meyer JL (2001) Streams in the urban landscape. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 333-365.
- Penn DJ (2002) The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology* **108**, 1-21.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**, 844-855.
- Petranka J (1998) *Salamanders of the United States and Canada*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Pfennig DW, Sherman PW, Collins JP (1994) Kin recognition and cannibalism in polyphenic salamanders. *Behavioral Ecology* **5**, 225-232.
- Pfingsten RA, Walker CF (1978) Some nearly all black populations of *Plethodon cinereus* (Amphibia, Urodela, Plethodontidae) in northern Ohio. *Journal of Herpetology* **12**, 163-167.
- Phillips K (1990) Where have all the frogs and toads gone? *Bioscience* **40**, 422-424.
- Pickett STA, Parker VT, Fiedler PL (1992) The new paradigm in ecology: implications for conservation biology above the species level. Dans: *Conservation biology: the*

- theory and practice of nature conservation, preservation, and management.* (eds. Fiedler PL, Jain SK), pp. 65-88. Chapman and Hall, New York.
- Piertney SB, Oliver MK (2006) The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* **96**, 7-21.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**, 536-539.
- Pounds JA, Fogden MPL, Campbell JH (1999) Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* **398**, 611-615.
- Pouyat RV, Yesilonis ID, Szlavecz K, Csuzdi C, Hornung E, Korsos Z, Russell-Anelli J, Giorgio V (2008) Response of forest soil properties to urbanization gradients in three metropolitan areas. *Landscape Ecology* **23**, 1187-1203.
- Powell JR (1971) Genetic polymorphisms in varied environments. *Science* **174**, 1035-1036.
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* **1**, 215-222.
- Primack RB (2004) *A primer of conservation biology*. Sinauer, Sunderland.
- Primmer CR, Ellegren H, Saino N, Moller AP (1996) Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nature Genetics* **13**, 391-393.
- Primmer CR, Saino N, Moller AP, Ellegren H (1998) Unraveling the processes of microsatellite evolution through analysis of germ line mutations in barn swallows *Hirundo rustica*. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 1047-1054.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>.
- Ralls K, Ballou J (1983) Extinction: lessons from zoos. Dans: *Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations* (eds. Schonewald-Cox



- CM, S.M. C, MacBryde B, Thomas WL), pp. 164-184. Benjamin/Cummings, Menlo Park.
- Ralls K, Ballou JD, Templeton A (1988) Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation Biology* **2**, 185-193.
- Ralls K, Brugger K, Ballou J (1979) Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science* **206**, 1101-1103.
- Ramsden C (2008) Population genetics of *Ambystoma jeffersonianum* and sympatric unisexuals reveal signatures of both gynogenetic and sexual reproduction. *Copeia*, 586-594.
- Ramsden C, Beriault K, Bogart JP (2006) A nonlethal method of identification of *Ambystoma laterale*, *Ambystoma jeffersonianum* and sympatric unisexuals. *Molecular Ecology Notes* **6**, 261-264.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9197-9201.
- 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 DH, Hobbs GR (2004) The relationship between population size and temporal variability in population size. *Animal Conservation* **7**, 1-8.
- Reed HD (1908) A note on the coloration of *Plethodon cinereus*. *American Naturalist* **42**, 460-465.
- Reid JM, Arcese P, Keller LF (2008) Individual phenotype, kinship, and the occurrence of inbreeding in song sparrows. *Evolution* **62**, 887-899.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rich SS, Bell AE, Wilson SP (1979) Genetic drift in small populations of *Tribolium*. *Evolution* **33**, 579-584.
- Robert J-C (1994) *Atlas historique de Montréal*. Libre expression, Montréal.

- Robertson AV, Ramsden C, Niedzwiecki J, Fu J, Bogart JP (2006) An unexpected recent ancestor of unisexual *Ambystoma*. *Molecular Ecology* **15**, 3339-3351.
- Rodrigue D (1998a) Manuel technique : inventaires herpétofauniques. Programme d'inventaire de l'herpétofaune des parcs-nature de la Communauté urbaine de Montréal. Société d'histoire naturelle de la vallée du Saint-Laurent pour la Communauté urbaine de Montréal, Montréal.
- Rodrigue D (1998b) Manuel technique : recensements auditifs pour les anoues. Programme d'inventaire de l'herpétofaune des parcs-nature de la Communauté urbaine de Montréal. Société d'histoire naturelle de la vallée du Saint-Laurent pour la Communauté urbaine de Montréal, Montréal.
- Rohr JR, Raffel TR, Romansic JM, McCallum H, Hudson PJ (2008) Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17436-17441.
- Rosen M (1971) An erythristic *Plethodon cinereus* from Ste. Foy, Portneuf county, Québec. *The Canadian Field Naturalist* **85**, 326-327.
- Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanski I (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* **392**, 491-494.
- Safford RJ, Jones CG (1997) Did organochlorine pesticide use cause declines in Mauritian forest birds? *Biodiversity and Conservation* **6**, 1445-1451.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- San Mauro D, Vences M, Alcobendas M, Zardoya R, Meyer A (2005) Initial diversification of living amphibians predated the breakup of Pangaea. *American Naturalist* **165**, 590-599.
- Savolainen O, Hedrick P (1995) Heterozygosity and fitness : no association in Scots Pine. *Genetics* **140**, 755-766.

- Schlötterer C, Wiehe T (1999) Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. Dans: *Microsatellites: evolution and applications* (eds. Goldstein DB, Schlötterer C), pp. 238-248. Oxford University Press, Oxford.
- Schlupp I (2005) The evolutionary ecology of gynogenesis. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **36**, 399-417.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Schultz RJ (1969) Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *American Naturalist* **103**, 605-619.
- Schultz RJ (1971) Special adaptive problems associated with unisexual fishes. *American Zoologist* **11**, 351-360.
- Scribner KT, Pearce JM (2000) Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. Dans: *Molecular Methods in Ecology* (ed. Baker A). Blackwell Science, Ltd., Oxford.
- Sessions SK (1982) Cytogenetics of diploid and triploid salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex. *Chromosoma* **84**, 599-621.
- Slate J, Kruuk LEB, Marshall TC, Pemberton JM, Clutton-Brock TH (2000) Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **267**, 1657-1662.
- Slawski TM, Veraldi FM, Pescitelli SM, Pauers MJ (2008) Effects of tributary spatial position, urbanization, and multiple low-head dams on warmwater fish community structure in a midwestern stream. *North American Journal of Fisheries Management* **28**, 1020-1035.
- Soulé ME, Yang SY, Weiler MGW, Gorman GC (1973) Island lizards: the genetic-phenetic variation correlation. *Nature* **242**, 191-193.

- Soulé ME, Zegers GP (1996) Phenetics of natural populations. V. Genetic correlates of phenotypic variation in the pocket gopher (*Thomomys bottae*) in California. *Journal of Heredity* **87**, 341-350.
- Spolsky C, Phillips CA, Uzzell T (1992) Gynogenetic reproduction in hybrid mole salamanders (genus *Ambystoma*). *Evolution* **46**, 1935-1944.
- Statistics Canada (2000) Human activity and the environment, 2000. Statistics Canada, Ottawa
- Statistics Canada (2008) Human activity and the environment: annual statistics 2007 and 2008. Statistics Canada, Ottawa.
- Stokstad E (2004) Ecology : Global survey documents puzzling decline of amphibians. *Science* **306**, 391.
- Storey KB, Storey JM (1986) Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* **83**, 613-617.
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD (1993) Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**, 274-276.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* **306**, 1783-1786.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* **15**, 199-203.
- Sutherland GR, Richards RI (1995) Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3636-3641.
- Szulkin M, Garant D, McCleery RH, Sheldon BC (2007) Inbreeding depression along a life-history continuum in the great tit. *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 1531-1543.

- Tait CJ, Daniels CB, Hill RS (2005) Changes in species assemblages within the Adelaide Metropolitan Area, Australia, 1836-2002. *Ecological Applications* **15**, 346-359.
- Takami Y, Koshio C, Ishii M, Fujii H, Hidaka T, Shimizu I (2004) Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. *Molecular Ecology* **13**, 245-258.
- Taub F (1961) The distribution of the red-backed salamander, *Plethodon c. cinereus*, within the soil. *Ecology* **42**, 681-698.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.
- Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12**, 4127-4138.
- Templeton AR (1994) Biodiversity at the molecular genetic level experiences from disparate macroorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **345**, 59-64.
- Tessier N, Noël S, Lapointe FJ (2004) A new method to discriminate the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) from the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) using species-specific primers in multiplex PCR. *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie* **82**, 1832-1835.
- Tessier N, Paquette S, Lapointe FJ (2005) Conservation genetics of the wood turtle (*Glyptemys insculpta*) in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne De Zoologie* **83**, 765-772.
- Test F, Bingham B (1948) Census of a population of the red-backed salamander (*Plethodon cinereus*). *American Midland Naturalist* **39**, 362-372.
- Test FH (1952) Spread of the black phase of the red-backed salamander in Michigan. *Evolution* **6**, 197-203.
- Thurrow G (1961) A salamander color variant associated with glacial boundaries. *Evolution* **15**, 281-287.
- Thursz MR, Thomas HC, Greenwood BM, Hill AVS (1997) Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection. *Nature Genetics* **17**, 11-12.

- Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* **10**, 967-981.
- Trusilova K, Jung M, Churkina G, Karstens U, Heimann M, Claussen M (2008) Urbanization impacts on the climate in Europe: numerical experiments by the PSU-NCAR mesoscale model (MM5). *Journal of Applied Meteorology and Climatology* **47**, 1442-1455.
- Tyler MJ, Davies M (1985) The gastric brooding frog. Dans: *Biology of Australasian frogs and reptiles* (eds. Grigg G, Shine R, Ehmann H). Royal Zoological Society of New South Wales, Sydney.
- UNCDB (2005) UN Common Database , accessed by Globalis : an interactive world map.
- UNFPA (1999) State of the world population 1999 : 6 billion: a time for choices. United Nations Population Fund, New York.
- UNFPA (2007) State of the world population 2007: unleashing the potential urban growth. United Nations Population Fund, New York.
- United Nations Population Division (2004) World urbanization prospects : the 2003 revision. United Nations Department of Economic and Social Affairs, New York.
- Uzzell TMJ (1964) Relations of the diploid and triploid species of the *Ambystoma jeffersonianum* complex (Amphibia, Caudata). *Copeia* **1964**, 257-299.
- Uzzell TMJ (1969) Notes on the spermatophore production by salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex. *Copeia* **1969**, 602-612.
- Vallet J, Daniel H, Beaujouan V, Roze F (2008) Plant species response to urbanization: comparison of isolated woodland patches in two cities of north-western France. *Landscape Ecology* **23**, 1205-1217.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Vandergast AG, Bohonak AJ, Weissman DB, Fisher RN (2007) Understanding the genetic effects of recent habitat fragmentation in the context of evolutionary history: phylogeography and landscape genetics of a southern California endemic Jerusalem

- cricket (Orthoptera : Stenopelmatidae : *Stenopelmatus*). *Molecular Ecology* **16**, 977-992.
- Vandewoestijne S, Schtickzelle N, Baguette M (2008) Positive correlation between genetic diversity and fitness in a large, well-connected metapopulation. *BMC Biology* **6**.
- Venier LA, Pearce JL, Wintle BA, Bekessy SA (2007) Future forests and indicator-species population models. *Forestry Chronicle* **83**, 36-40.
- Ville de Montréal (2004) Plan d'urbanisme de Montréal. Ville de Montréal, Montréal.
- Ville de Montréal (2007) Montréal en bref. Ville de Montréal, Montréal.
- Vitt LJ, Caldwell JP, Wilbur HM, Smith DC (1990) Amphibians as harbingers of decay. *Bioscience* **40**, 418-418.
- Vos CC, Antonisse-De Jong AG, Goedhart PW, Smulders MJM (2001) Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity* **86**, 598-608.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandeele T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Vrijenhoek RC, Dawley RM, Cole CJ, Bogart JP (1989) A list of the known unisexual vertebrates. Dans: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* (eds. Dawley RM, Bogart JP), pp. 19-23. New York State Museum, Albany.
- Waldman B (1988) The ecology of kin recognition. *Annual Review of Ecology and Systematics* **19**, 543-571.
- Walls SC, Roudebush RE (1991) Reduced aggression toward siblings as evidence of kin recognition in cannibalistic salamanders. *American Naturalist* **138**, 1027-1038.
- Wandeler P, Funk SM, Largiader CR, Gloor S, Breitenmoser U (2003) The city-fox phenomenon: genetic consequences of a recent colonization of urban habitat. *Molecular Ecology* **12**, 647-656.
- Waser NM, Williams CF (2001) Inbreeding and outbreeding. Dans: *Evolutionary ecology: concepts and case studies* (eds. Fox CW, Roff DA, Fairbain DJ), p. 424. Oxford University Press, Oxford.

- Waser PM, Strobeck C (1998) Genetic signatures of interpopulation dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* **13**, 43-44.
- Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* **44**, 388-396.
- Welsh HH, Droege S (2001) A case for using plethodontid salamanders for monitoring biodiversity and ecosystem integrity of North American forests. *Conservation Biology* **15**, 558-569.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**, 7213-7218.
- White MJD (1978) *Modes of speciation*. Freeman, W. H., San Francisco.
- White TA, Searle JB (2007) Genetic diversity and population size: island populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *Molecular Ecology* **16**, 2005-2016.
- Wiens JA (1996) Wildlife in patchy environments: metapopulations, mosaics and management. Dans: *Metapopulations and wildlife conservation* (ed. McCullough DR), pp. 53-84. Island Press, Washington, D.C.
- Wilbur HM (1976) A sequential sampling procedure for identifying triploid salamanders. *Copeia* **1976**, 391-392.
- Wilcove DS, McLellan CH, Dobson AP (1986) Habitat fragmentation in the temperate zone. Dans: *Conservation Biology* (ed. Soulé ME). Sinauer, Sunderland, MA.
- Wilcox BA, Murphy DD (1985) Conservation strategy : the effects of fragmentation on extinction. *American Naturalist* **125**, 879-887.
- Wildt DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, O'Brien SJ (1987) Reproductive and genetic isolation of founding isolated lion population. *Nature* **329**, 328-331.
- Williams EE, Highton R, Cooper DM (1968) Breakdown of polymorphism of the red-backed salamander on Long Island. *Evolution* **22**, 76-86.



- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Woltz HW, Gibbs JP, Ducey PK (2008) Road crossing structures for amphibians and reptiles: informing design through behavioral analysis. *Biological Conservation* **141**, 2745-2750.
- Wright S (1977) *Evolution and the genetics of populations, vol. 3. Experimental results and evolutionary deductions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 413-418.
- Yuhki N, O'Brien SJ (1990) DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 836-840.
- Zardoya R, Meyer A (2001) On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7380-7383.
- Zhang P, Chen YQ, Zhou H, Wang XL, Qu LH (2003) The complete mitochondrial genome of a relic salamander, *Ranodon sibiricus* (Amphibia : Caudata) and implications for amphibian phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **28**, 620-626.
- Zhang P, Zhou H, Chen YQ, Liu YF, Qu LH (2005) Mitogenomic perspectives on the origin and phylogeny of living amphibians. *Systematic Biology* **54**, 391-400.