

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Eau Terre Environnement

Effet des ponceaux forestiers sur la distribution de la diversité génétique chez l'omble de fontaine au sein d'un bassin versant boréal

Par

Jean-Baptiste Torterotot

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
En sciences de la terre

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Patrice Couture INRS centre Eau Terre Environnement
Examineur externe	Simon Blanchet CNRS, Station d'Écologie Expérimentale
Directeur de recherche	Normand E. Bergeron INRS centre Eau Terre Environnement
Codirecteur de recherche	Louis Bernatchez Université Laval

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de recherche, le professeur Normand Bergeron pour son soutien, sa confiance et ses nombreux encouragements durant ces dernières années.

Un grand merci également au professeur Louis Bernatchez pour avoir accepté de me codiriger ainsi que pour ses précieux conseils tout au long de ce projet.

Je tiens également à adresser mes remerciements les plus sincères au Docteur Charles Perrier pour l'énergie et le temps qu'il a investi à m'encadrer, à me former, à me soutenir et sans qui cette recherche n'aurait pas été la même.

Mes remerciements les plus sincères aux membres des laboratoires Bergeron et Bernatchez, notamment : Steve Dugdale, Elsa Goerig, Carole-Anne Gillis, Guillaume Côté, Laura Benestan, Anne-Marie Dion Côté qui m'ont soutenu et aidé tout au long de cette maîtrise.

Je suis également particulièrement reconnaissant envers mes assistants avec qui j'ai partagé des étés de terrain formidables et qui ont su m'aider, me conseiller et me motiver dans les moments les plus difficiles : Gabriel Gerzabek, Flavien Pichon, Maxime Sirois, Charles-Olivier Boulianne, je vous remercie.

Enfin, je tiens à remercier le Ministère des Ressources Naturelles pour sa collaboration ainsi que le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies qui a financé ce projet dans le cadre du programme de recherche en partenariat sur la forêt boréale au Saguenay-Lac-Saint-Jean-II.

RÉSUMÉ

Conséquence directe de l'expansion humaine et des aménagements qui en découlent, le phénomène de fragmentation des habitats figure aujourd'hui parmi les enjeux majeurs en biologie de la conservation. Les routes constituent l'une des principales sources de fragmentation des habitats aquatiques puisqu'elles engendrent, en milieu riverain, l'installation de nombreuses traverses de cours d'eau. L'objet principal de cette étude était de mesurer l'effet des barrières anthropiques liées aux infrastructures de transport (ponceaux) sur la distribution de la diversité génétique chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et dans un second temps, de le comparer à celui résultant de la présence de barrières naturelles aux flux de gènes (chutes naturelles).

Au cours de l'été 2012, 25 sites ont été échantillonnées dans un bassin versant boréal fragmenté par des chutes naturelles et des ponceaux forestiers. Au total, 996 individus ont été génotypés à l'aide de 16 marqueurs microsatellites. En tenant compte de l'influence relative de différents facteurs environnementaux, nous avons testé si la présence de chutes naturelles et de ponceaux forestiers résultait en une diminution de la diversité génétique des populations situées en amont de ces barrières et en une augmentation de la différenciation génétique entre ces dernières. Par ailleurs, considérant que les ponceaux constituent effectivement un obstacle aux flux géniques, nous avons testé si les caractéristiques physiques de ces structures avaient une influence sur le degré de connectivité génétique entre les localités échantillonnées.

Les résultats témoignent d'une différenciation génétique plus importante entre les sites séparés par des barrières (chutes et ponceaux) ainsi que d'une diversité génétique plus faible en amont de ces dernières. D'après nos analyses, l'effet des ponceaux sur la distribution de la diversité génétique chez l'omble de fontaine était légèrement plus prononcé que celui des chutes naturelles. Par ailleurs, les analyses ont permis de mettre en évidence un effet cumulatif des ponceaux forestiers avec des indices génétiques négativement corrélés au nombre de ponceaux situées à l'aval (diversité génétique) ou entre (différenciation génétique) les sites échantillonnés. Nos résultats indiquent également que la présence d'une chute d'eau à l'extrémité aval des ponceaux accentue l'impact de ces structures sur les flux géniques. A notre connaissance cette étude est la première à illustrer l'effet des ponceaux forestiers sur la distribution de la diversité génétique chez l'omble de fontaine dans un bassin versant boréal.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
STRUCTURE DU MÉMOIRE.....	xiii
PARTIE 1 : SYNTHÈSE.....	1
1. INTRODUCTION.....	3
1.1. Contexte.....	3
1.2. Problématique.....	4
1.3. Objectifs.....	6
2. CONCEPTS CLÉS.....	7
2.1. La fragmentation des habitats.....	7
2.2. Conséquences écologiques de la fragmentation des habitats.....	8
2.3. Conséquences génétiques de la fragmentation des habitats.....	9
2.4. La fragmentation des habitats par les ponceaux.....	10
3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS.....	13
3.1. Site d'étude.....	13
3.2. Échantillonnage.....	17
3.3. Géotypage.....	19
3.4. Analyses.....	19
4. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	21
5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....	25

PARTIE 2 : ARTICLE	27
AVANT-PROPOS	29
RÉSUMÉ	31
ABSTRACT	33
1. INTRODUCTION	39
2. MATERIALS AND METHODS	43
2.1. Study site	43
2.2. Fish sampling	43
2.3. Genotyping	45
2.4. Analysis of the distribution of genetic diversity	455
2.5. Riverscape genetics	46
3. RESULTS	49
3.1. Barriers characteristics	49
3.2. Analysis of the distribution of genetic diversity	50
3.3. Riverscape genetics	55
4. DISCUSSION	61
4.1. Fine scale distribution of genetic diversity	61
4.2. Impact of culverts on the distribution of genetic diversity	62
4.3. Limitations related to the geographic distribution of culverts	624
4.4. Impact of waterfalls on the distribution of genetic diversity	645
4.5. Management implications	66
REFERENCES	69
ANNEXES	79

LISTE DES FIGURES

PARTIE 1 : SYNTHÈSE

Figure 1	Processus de fragmentation par les routes	4
Figure 2	Ponceau forestier.....	5
Figure 3	Phénomène de fragmentation des habitats dans le temps.....	7
Figure 4	Exemples d'obstacles physiques aux déplacements issus d'une mauvaise installation ou d'un manque d'entretien des ponceaux	10
Figure 5	Carte des bassins versants de la région Saguenay-Lac Saint-Jean et représentation par âge des secteurs forestiers perturbés	14
Figure 6	Localisation géographique du sous-bassin versant de la rivière Saint-Louis et du bassin versant de la rivière Valin.....	15
Figure 7	Ponceaux forestiers et chutes naturelles du bassin versant Saint-Louis	16
Figure 8	Localisation des sites d'échantillonnage; ponceaux; chutes naturelles	18

PARTIE 2 : ARTICLE

Figure 1	Locations of the twenty five sampling sites in the Saint-Louis River watershed.....	44
Figure 2	Geographical repartition of allelic richness and private alleles among the twenty-five sampling locations	51
Figure 3	Bayesian individual clustering results with BAPS	53
Figure 4	Correspondence factor analysis illustrating genetic distances among locations.....	54
Figure 5	Relationship between geographic features and mean allelic richness and pairwise <i>Fst</i> estimates	58

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE 1 : SYNTHÈSE

Tableau 1	Classification par âge des superficies forestières perturbées.....	14
Tableau 2	Variables explicatives testées sur les valeurs de richesse allélique et de <i>Fst</i>	20

PARTIE 2 : ARTICLE

Table 1	Physical characteristics of the nineteen culverts retained for the study	49
Table 2	Sampling locations in the Saint-Louis River basin and description of sampling characteristics: sample size, allelic richness, unbiased expected heterozygosity, number of private alleles	50
Table 3	Analysis of molecular variance.....	555
Table 4	Correlations of landscape variables with genetic diversity and genetic differentiation.....	56
Table 5	(A) Multiple regression analysis on allelic richness; (B) Multiple regression on distance matrix on pairwise <i>Fst</i>	59

STRUCTURE DU MÉMOIRE

Ce mémoire est articulé en 2 parties distinctes :

- Une première partie, dénommée «**Synthèse**» qui correspond à un résumé de la contribution scientifique de l'étudiant et s'articulant en cinq chapitres.
 - Un premier chapitre d'introduction où sont exposés le contexte et la problématique de l'étude ainsi que les objectifs de la recherche faite par l'étudiant.
 - Un second chapitre dans lequel sont brièvement abordés différents concepts clés nécessaires à la compréhension de l'étude présentée dans ce mémoire.
 - Un troisième chapitre où sont succinctement présentés le site d'étude et la méthodologie employée pour mener la recherche.
 - Un quatrième chapitre dans lequel sont présentés et discutés les principaux résultats de cette étude.
 - Un cinquième chapitre de conclusions et recommandations qui clôt cette première partie de synthèse.
- Une seconde partie dénommée «**Article**» correspondant à la copie de l'article scientifique rédigé par le candidat et accepté pour publication dans la revue « *Transactions of the American Fisheries Society* ».

Viennent ensuite les références groupées de l'article et du travail de synthèse.

PARTIE 1 : SYNTHÈSE

1. INTRODUCTION

1.1. Contexte

Avec plus de 5 600 km de chemins forestiers ouverts chaque année pour satisfaire aux activités forestières, minières ou de loisir, on estime à plus de 10 000 le nombre de traverses de cours d'eau installées annuellement dans les forêts publiques de Québec (Prévost, et *al.* 2002). En raison de leur facilité d'installation et de leur faible coût, les ponceaux constituent le type de traverse le plus couramment mis en place pour le franchissement des cours d'eau de petite taille, assurant théoriquement le libre écoulement des eaux et la libre circulation des poissons. De nombreuses études ont cependant démontré l'effet potentiellement négatif des ponceaux sur la faune aquatique et ses habitats (Chestnut 2002, Harper and Quigley 2002, Langlill and Zamora 2002, Gibson et *al.* 2005). Il est ainsi reconnu que les ponceaux peuvent favoriser l'introduction de sédiments fins dans les cours d'eau, perturber l'hydraulique du cours d'eau et nuire ou empêcher la libre circulation des poissons. Plusieurs études effectuées au Québec et ailleurs ont permis d'analyser les deux premiers aspects de cette problématique. Cependant, la problématique du libre passage des poissons dans les ponceaux forestiers demeure encore mal connue.

Cette étude s'inscrit dans un projet pluridisciplinaire portant sur la thématique générale de la fragmentation des habitats par les ponceaux forestiers financé par le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQNT) dans le cadre du programme de recherche en partenariat sur la forêt boréale au Saguenay-Lac-Saint-Jean-II. Ce projet, réalisé en collaboration avec le Ministère des Ressources Naturelles (MRN) de la région Saguenay-Lac Saint-Jean, permet d'enrichir les connaissances sur les conséquences de ces infrastructures sur les populations d'ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), espèce d'importance économique et culturelle pour la province du Québec. Les résultats de ce projet permettront d'optimiser la gestion des systèmes dendritiques fragmentés par les ponceaux ainsi que d'orienter les futurs aménageurs vers un développement durable des réseaux routiers forestiers.

1.2. Problématique

De par leur densité sur l'ensemble de la planète, les routes constituent aujourd'hui l'une des principales sources anthropiques de fragmentation des habitats (Forman and Alexander 1998). Véritable menace à l'intégrité paysagère, elles engendrent en effet le morcellement de territoires de vaste étendue en une multitude d'habitats de taille réduite, induisant par conséquent la séparation physique des populations animales et végétales qui leur sont inféodées (Trombulak and Frissell 2000) (Figure 1). L'envergure de la problématique de fragmentation par les routes est telle qu'elle a conduit le scientifique Forman (1983) à baptiser « Road ecology » la discipline à part entière traitant des répercussions écologiques de ces infrastructures sur les écosystèmes. De nombreuses études ont démontré les répercussions génétiques des routes sur les communautés terrestres (Epps et al. 2005, Holderegger and Di Giulio 2010). En revanche la question des populations piscicoles et de l'impact génétique lié à la fragmentation des habitats aquatiques par les traverses de cours d'eau n'a, jusqu'à présent, reçu que peu d'intérêt de la part de la communauté scientifique.

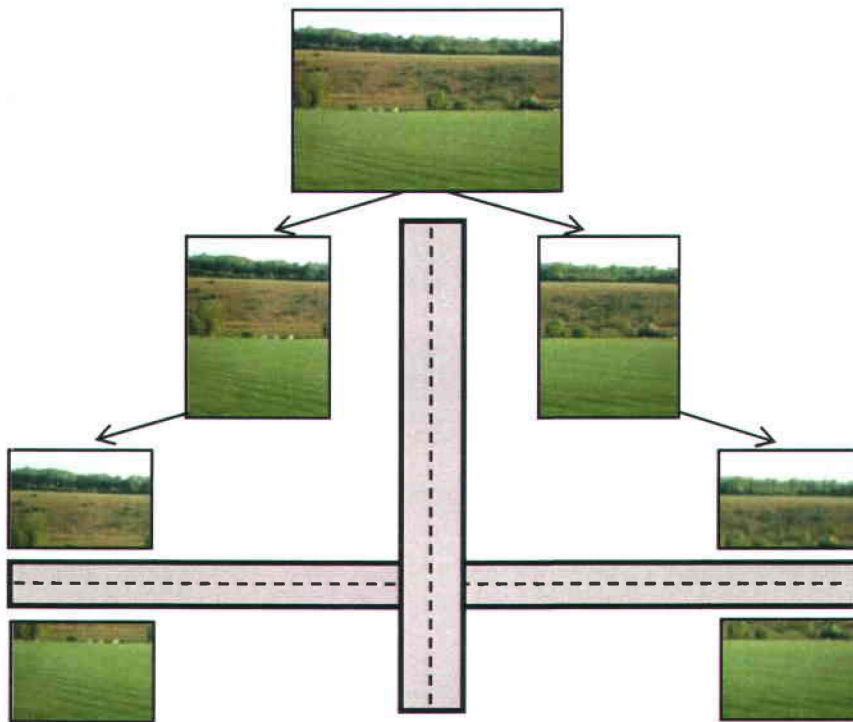


Figure 1 Processus de fragmentation par les routes

L'absence de données génétiques sur la thématique des traverses de cours d'eau est d'autant plus surprenante que la fréquence de ces infrastructures ne cesse de croître en réponse aux développements routiers sur l'ensemble de la planète et qu'il est reconnu que la fragmentation des habitats aquatiques nuit à la santé des populations piscicoles en impactant la circulation des poissons entre les différents habitats nécessaires à la réalisation complète de leur cycle de vie. Ainsi, Morita et Yamamoto (2002) ont montré qu'en situation de fragmentation d'habitat, les petites populations isolées sont destinées à s'appauvrir et souvent à disparaître. Le besoin d'informations sur les conséquences génétiques des traverses de cours d'eau est donc réel et d'autant plus nécessaire dans le cas des ponceaux forestiers (Figure 2) dont la majorité est abandonnée suivant l'exploitation des massifs forestiers et dont les conséquences génétiques sur les populations piscicoles sont, par conséquent, possiblement exacerbées du fait de la dégradation physique découlant de leur abandon.



Figure 2 **Ponceau forestier**

1.3. Objectifs

L'objectif de ce projet était de documenter l'impact des ponceaux forestiers sur la distribution de la diversité génétique chez l'omble de fontaine à l'échelle d'un bassin versant boréal.

Les objectifs de recherche étaient les suivants:

- i) Déterminer quelles sont les principales variables environnementales liées aux patrons de diversité et de différenciation génétique observés dans le bassin versant à l'étude.
- ii) Mesurer l'effet du nombre de ponceaux et celui des chutes naturelles sur la distribution de diversité génétique afin de comparer les effets de la fragmentation d'origine anthropique à ceux de la fragmentation naturelle.
- iii) Vérifier si les caractéristiques physiques des ponceaux ont un effet sur les patrons de diversité et de différenciation génétique observés.

2. CONCEPTS CLÉS

2.1. La fragmentation des habitats

Comme précisé en introduction, ce projet de recherche s'inscrit dans la problématique générale de fragmentation des habitats. Le phénomène de fragmentation des habitats correspond au processus de morcellement de territoires de vaste étendue en une multitude de territoires de taille réduite et isolés les uns des autres par une matrice d'habitats dissimilaires (Wilcove et *al.* 1986) (Figure 3). Cette modification éco-paysagère peut être d'origine naturelle (ex : chaînes de montagnes, rivières, chutes d'eau etc....) ou anthropique (ex : barrages, routes, canaux...). Selon cette définition les milieux peuvent ainsi être qualitativement décrits comme «continus» ou «fragmentés» (Fahrig 2003).

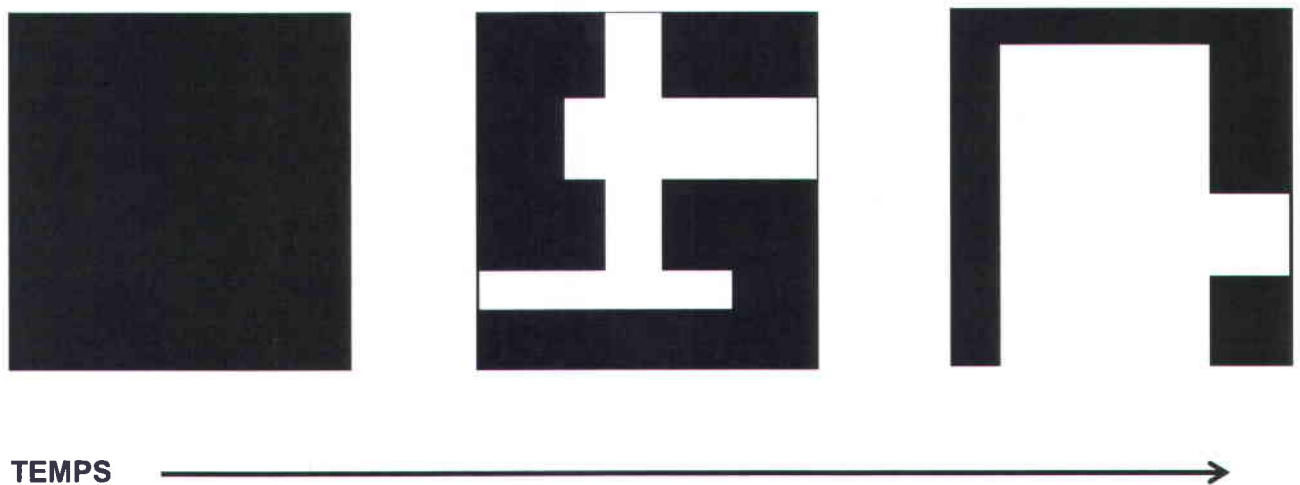


Figure 3 Phénomène de fragmentation des habitats dans le temps. Les zones foncées représentent l'habitat original, les zones claires la matrice d'habitats dissimilaires (d'après Fahrig 2003)

2.2. Conséquences écologiques de la fragmentation des habitats

Affectant les écosystèmes terrestres et aquatiques de la planète entière, le processus de fragmentation des habitats est aujourd'hui considéré comme l'une des plus importantes menaces pour la biodiversité (Zwick 1992, Hanski 1999, Fagan 2002). Les altérations écologiques engendrées par le phénomène de fragmentation des habitats ont été démontrées à travers une multitude d'études scientifiques portant sur différents groupes taxonomiques (mammifères, oiseaux, poissons, insectes, reptiles etc...), offrant une littérature étoffée sur le sujet.

- Perte d'habitat : Rarement distingués dans la littérature, les phénomènes de «perte» et de «fragmentation» d'habitats sont deux processus généralement corrélés (Fahrig 2003). Ainsi, en plus de l'effet de «découpage», les activités humaines à l'origine du morcellement des territoires (ex : urbanisation, déforestation ...) résultent généralement en la diminution, à plus ou moins longs termes de la superficie totale d'habitats disponibles pour les espèces peuplant les territoires perturbés (Andrén 1994, Gibson et al. 2005).
- Isolation de populations de petite taille : Suite au phénomène de fragmentation, les populations inféodées aux milieux perturbés se retrouvent isolées dans les patches d'habitats fragmentés (Herbener et al. 2012). En accord avec la théorie de la biogéographie insulaire élaborée par Mac Arthur et Wilson en 1967 (Mac Arthur, 1967), le nombre d'espèces ainsi que le nombre d'individus par espèce rencontré au sein des habitats fragmentés varie avec la superficie et le degré d'isolement de ces derniers. Ainsi, les patches d'habitat de faible étendue les plus isolés contiennent généralement moins d'espèces et de plus petites populations que les patches d'habitats plus larges et moins isolés. De telles observations ont été notées chez différentes espèces animales et végétales suite au phénomène de fragmentation (Andrén 1994, Baur and Erhardt 1995, Collinge 1995, Gonzalez et al. 1998, Coudrain et al. 2013).
- Perturbation des patrons de dispersion : Les discontinuités écologiques engendrées par le phénomène de fragmentation peuvent constituer de véritables barrières aux déplacements de diverses espèces (Ovidio and Philippart 2002, Schtickzelle et al. 2006, Benton et al. 2008). Les mouvements d'individus entre les patches d'habitat isolés sont

alors conditionnés par la capacité de dispersion des espèces isolées ainsi que par l'étendue et la nature des d'habitats situés entre les patches d'habitat (Peacock and Smith 1997, McGarigal et *al.* 2002, Fahrig 2003, Schaefer et *al.* 2003).

2.3. Conséquences génétiques de la fragmentation des habitats

L'isolement géographique de populations de petite taille ainsi que la réduction des échanges d'individus inter-populations constituent deux des principales conséquences du phénomène de fragmentation des habitats. D'un point de vue théorique, la réduction du nombre de migrants se traduit par une diminution des flux de gènes entre les populations isolées pouvant résulter, au fil du temps, en la différenciation génétique de ces dernières (Levins 1969). Par ailleurs, il est reconnu que les effets des phénomènes de consanguinité et de dérive génétique sont exacerbés dans les populations de petites tailles (Ellstrand and Elam 1993). Les populations isolées sont par conséquent sujettes à une perte de diversité génétique (Hanski 1999, Couvet 2002, Dixo et *al.* 2009), entraînant à long terme un risque d'extinction dû à la réduction de leur potentiel adaptatif et à une sensibilité accrue à la stochasticité environnementale et démographique (Hanski 1999).

Grâce aux récents progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire et face à l'accroissement continu de la problématique de fragmentation des habitats, la dernière décennie a connu une augmentation importante du nombre d'études portant sur les conséquences génétiques de ce phénomène (Keyghobadi 2007). De nombreuses études ont ainsi confirmé les principes théoriques mentionnés ci-dessus en démontrant notamment que les ruptures de connectivité engendrées par le phénomène de fragmentation peuvent avoir des effets sur la structure et la diversité génétique de différentes espèces. Ainsi, à titre d'exemple, différentes études portant sur les mammifères (Epps et *al.* 2005), les oiseaux (Harrisson et *al.* 2012) ou encore sur les poissons (Morita et *al.* 2009) ont mis en évidence que la fragmentation des habitats pouvait entraîner la différenciation génétique des populations isolées ainsi qu'une perte de diversité au sein de ces dernières. Il a également été démontré que la sensibilité génétique à la fragmentation des habitats était variable selon les espèces, conditionnée en partie par leur capacité relative de dispersion (Debinski and Holt 2000, Blanchet et *al.* 2010).

2.4. La fragmentation des habitats par les ponceaux

Diverses études ont démontré l'effet potentiellement négatif des ponceaux sur la faune aquatique et ses habitats (Chestnut 2002, Harper and Quigley 2002, Langlill and Zamora 2002, Gibson et al. 2005). De nombreux travaux réalisés sur la thématique de la circulation dans les ponceaux ont notamment mis en évidence que la présence de ces structures pouvait avoir des répercussions sur la mobilité et la répartition de différentes espèces piscicoles (Warren Jr and Pardew 1998, Benton, Ensign et al. 2008, Norman et al. 2009, Pépino et al. 2012). Ainsi, il a été démontré que les ponceaux pouvaient réduire la probabilité des mouvements de différentes espèces de poissons (Benton et al. 2008; Norman et al. 2009) ayant pour conséquence de fragmenter l'habitat disponible en empêchant ou en réduisant l'accès aux portions de cours d'eau situées en amont de ces structures (Gibson et al. 2005, Park et al. 2008). Par ailleurs, d'autres travaux ont mis en évidence des discontinuités majeures dans la distribution de certaines espèces résultant de la présence de ponceaux (Wheeler et al. 2005, Pépino et al. 2012), témoignant là encore d'un impact de ces structures sur la dispersion des espèces piscicoles. Ces altérations résultent généralement de barrières physiques aux déplacements au niveau même des ponceaux (Figure 4) (vitesses/pentes excessives, chutes d'eau en sortie de ponceau, obstruction), conséquence d'une mauvaise installation ou d'un manque d'entretien.

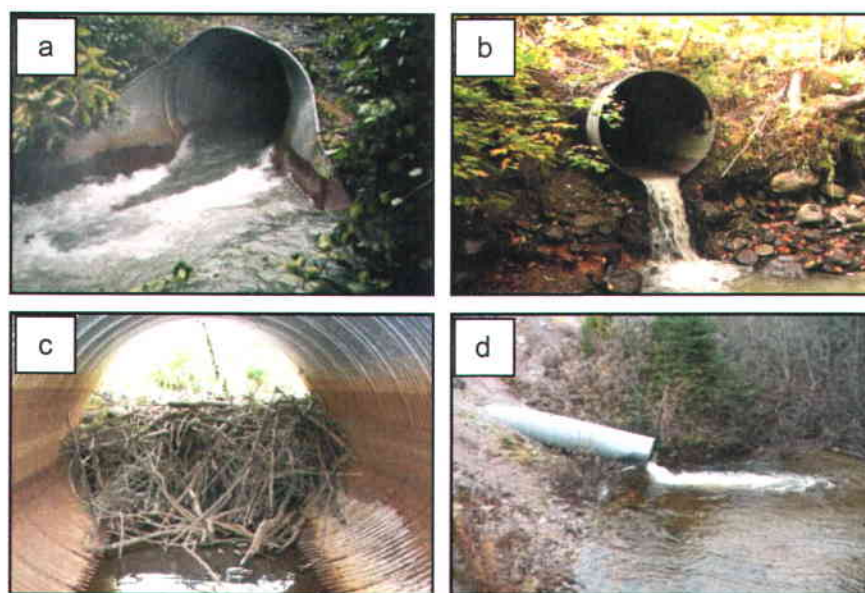


Figure 4 Exemples d'obstacles physiques aux déplacements issus d'une mauvaise installation ou d'un manque d'entretien des ponceaux (a) vitesses excessives (b) chute en sortie de ponceau (c) obstruction (d) pente excessive

Toutefois, la majorité de ces observations sont issues d'études reposant sur des techniques « directes » de suivi (capture-marquage-recapture) dont la résolution spatio-temporelle est souvent limitée par des contraintes logistiques et matérielles et dont il est par conséquent difficile voir impossible de tirer des conclusions en termes de connectivité génétique.

3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

3.1. Site d'étude

La sélection du site d'étude s'est faite au regard de quatre principaux critères :

- Localisation dans la région du Saguenay-Lac Saint-Jean
- Présence d'un réseau dendritique facilement accessible
- Présence de ponceaux anciens
- Présence d'ombles de fontaine

La recherche des sites potentiels pour mener cette étude a tout d'abord consisté en une analyse cartographique détaillée de la région du Saguenay-Lac Saint-Jean. Les différentes bases de données ou cartes utilisées pour cette phase d'investigation ont été gracieusement fournies par le Ministère des Ressources Naturelles (MRN) et par Ressources Naturelles Canada (RNCAN). Il s'agissait notamment des données suivantes:

- Réseaux routiers et chemins forestiers (MRN)
- Superficies forestières perturbées (coupe ou plantation) (MRN)
- Délimitation des bassins versants (MRN)
- Feuillet topographique 1 : 50 000 (RNCAN)

Malheureusement, aucun inventaire des ponceaux forestiers de la région étudiée n'existe à l'heure actuelle. Afin de contourner ce manque d'informations, nous avons développé une méthodologie basée sur l'analyse cartographique des réseaux routiers forestiers et dendritiques. Dans un premier temps, les coupes forestières ont été cartographiées et classifiées par âge en se basant sur les années d'intervention (Tableau 1, Figure 5). Par la suite, la présence potentielle de ponceaux a été déterminée en répertoriant visuellement, pour chaque bassin versant, les intersections entre les chemins forestiers et les cours d'eau. Les efforts ont été concentrés sur les bassins versants les plus anciennement perturbés, supposant que l'âge d'ouverture des chemins forestiers, et donc des traverses de cours d'eau, correspond à l'année des coupes forestières.

Tableau 1 **Classification par âge des superficies forestières perturbées**

	Classes d'âge (années)
	46-60
	41-45
	36-40
	31-35
	26-30
	21-25
	16-20
	11-15
	6-10
	5 et moins

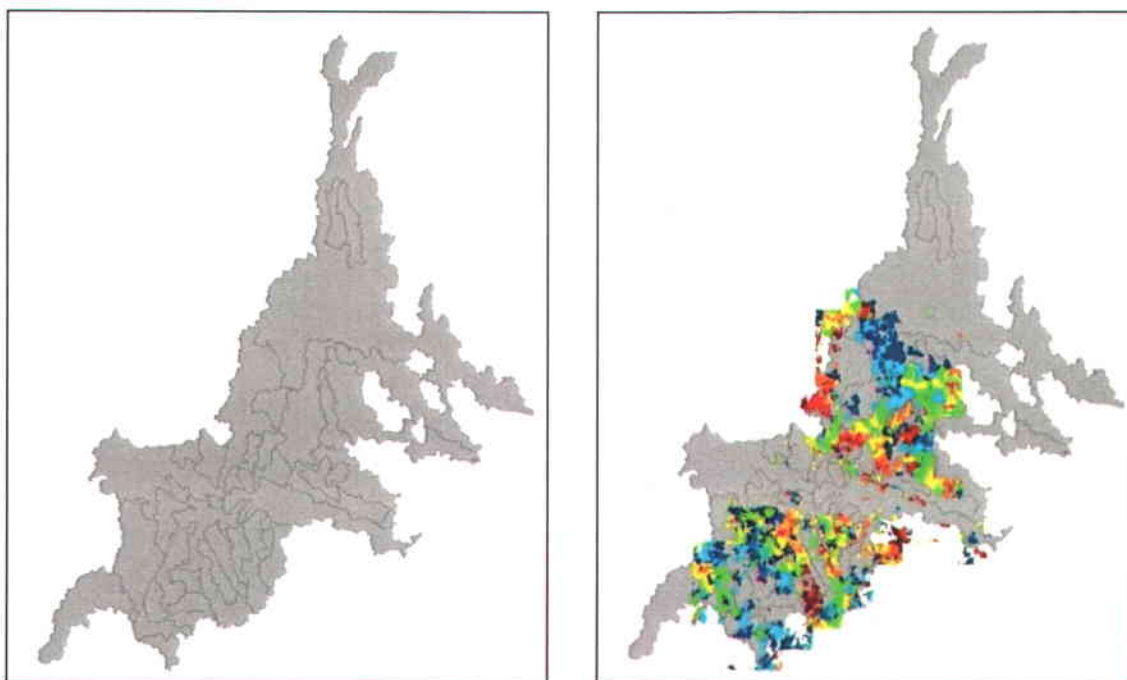


Figure 5 **Carte des bassins versants de la région Saguenay-Lac Saint-Jean (gauche) et représentation par âge des secteurs forestiers perturbés (droite)**

Suite à diverses campagnes de terrain menées dans la région Saguenay-Lac Saint-Jean, le choix du site d'étude s'est finalement porté sur le bassin versant de la rivière Saint-Louis (sous bassin du bassin versant de la rivière Valin) situé au nord du village de Saint-David de Falardeau, au Saguenay (Figure 6).

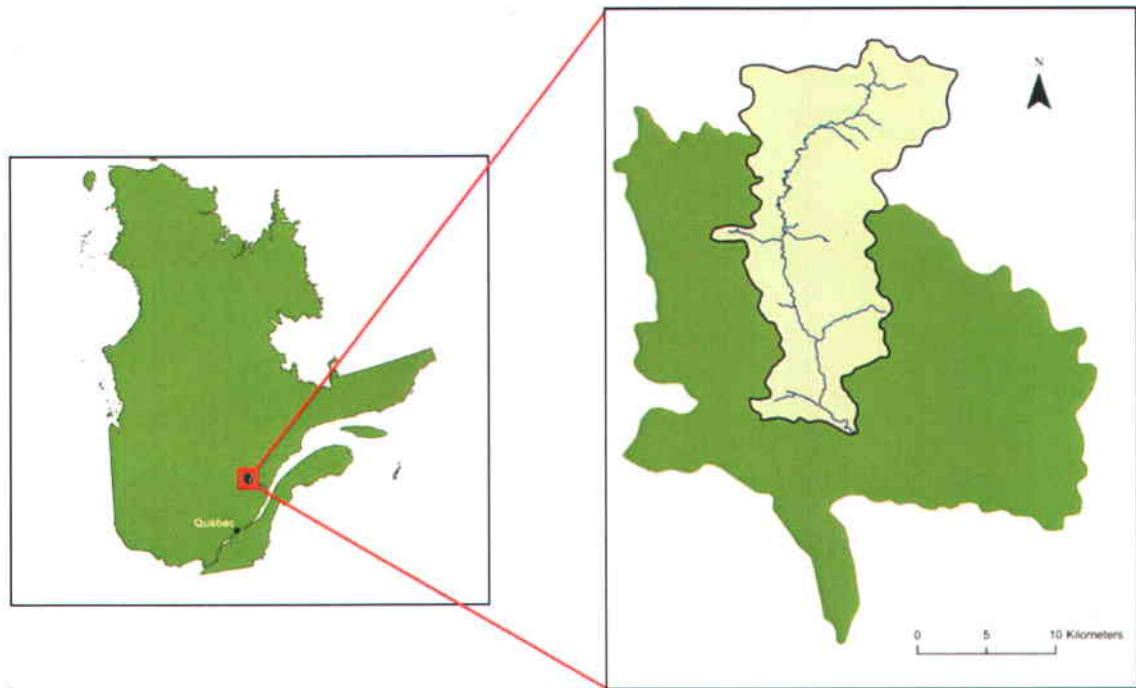


Figure 6 Localisation géographique du sous-bassin versant de la rivière Saint-Louis (vert pâle) et du bassin versant de la rivière Valin (vert foncé)

D'une superficie de 239 km², ce bassin versant a longtemps été exploité par l'industrie forestière, engendrant la création d'un important réseau de chemins forestiers ainsi que la mise en place de nombreuses traverses de cours d'eau durant les quatre dernières décennies. L'exploitation forestière est aujourd'hui de moindre importance sur ce territoire dont une partie est désormais gérée par la Zec Onatchiway pour les activités de pêche, de chasse et de villégiature, l'autre partie étant en territoires libres. D'une largeur moyenne de 25 m, la rivière Saint-Louis coure sur environ 35 km avant sa confluence avec la rivière Valin, affluent de la rivière Saguenay. Une campagne de terrain réalisée du 11 au 22 octobre 2010 a permis l'identification et la caractérisation de 69 ponceaux et de 4 chutes naturelles infranchissables (> 2 m) dans ce bassin versant (Figure 7). Chaque ponceau a fait l'objet de relevés de pente, de longueur et de hauteur de chute.

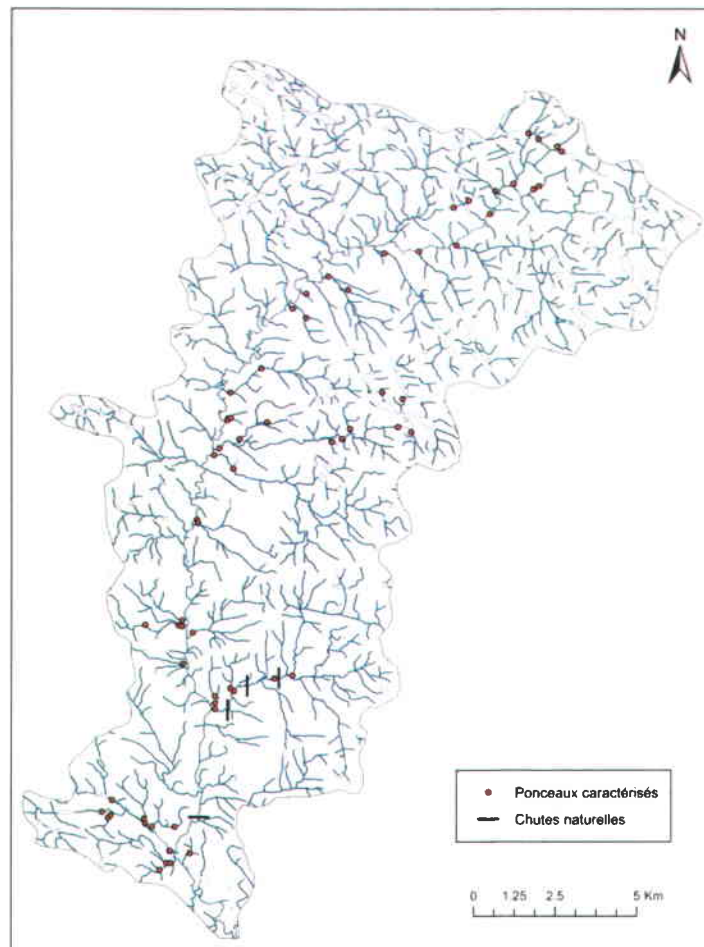


Figure 7 Ponceaux forestiers et chutes naturelles du bassin versant Saint-Louis

D'après nos observations, l'omble de fontaine résident est la principale espèce piscicole rencontrée dans le bassin versant, aucune autre espèce n'ayant été rencontrée lors des pêches à l'électricité réalisées dans le cadre de cette étude. La présence d'une barrière anthropique infranchissable sur la rivière Valin empêche par ailleurs toute montaison éventuelle d'individus anadromes depuis la rivière Saguenay.

La présence d'obstacles naturels ainsi que la densité et la distribution des structures anthropiques au sein du bassin versant en font un site de choix pour répondre aux objectifs de recherche exposés précédemment.

3.2. Échantillonnage

La sélection des sites d'échantillonnage s'est faite au regard de différents critères :

Budgétaire

- Le nombre de sites retenus a été déterminé au regard du budget alloué aux analyses génétiques (budget pour 1000 individus génotypés à 16 marqueurs microsatellites) et de l'effectif d'échantillonnage nécessaire à la conduite d'analyses génétiques et statistiques suffisamment robustes (~40 individus par site).

Géographique

- La répartition géographique des sites a été définie afin d'assurer une couverture globale du bassin versant, permettant de prendre en compte la potentielle variabilité génétique existant de manière naturelle dans le bassin versant à l'étude.
- Une attention particulière a été donnée à sélectionner des ponceaux aux caractéristiques physiques variées afin de tester l'éventuelle influence de ces facteurs sur la distribution de la diversité génétique.
- Les ponceaux sélectionnés devaient autant que faire se peut être le principal facteur de fragmentation des sites échantillonnés. Un effort a donc été fait pour retenir une majorité de sites situés sur des sections non fragmentées par des obstacles naturels.
- Afin de mesurer et de comparer les effets de la fragmentation naturelle issue de la présence de structures géomorphologiques à ceux résultants de la présence de ponceaux, quelques sites ont été échantillonnés en amont de chutes naturelles infranchissables.

Au regard des critères exposés ci-dessus, 25 sites d'échantillonnage répartis autour de 19 ponceaux et de 4 chutes naturelles infranchissables ont été choisis au sein du bassin versant à l'étude (Figure 8).

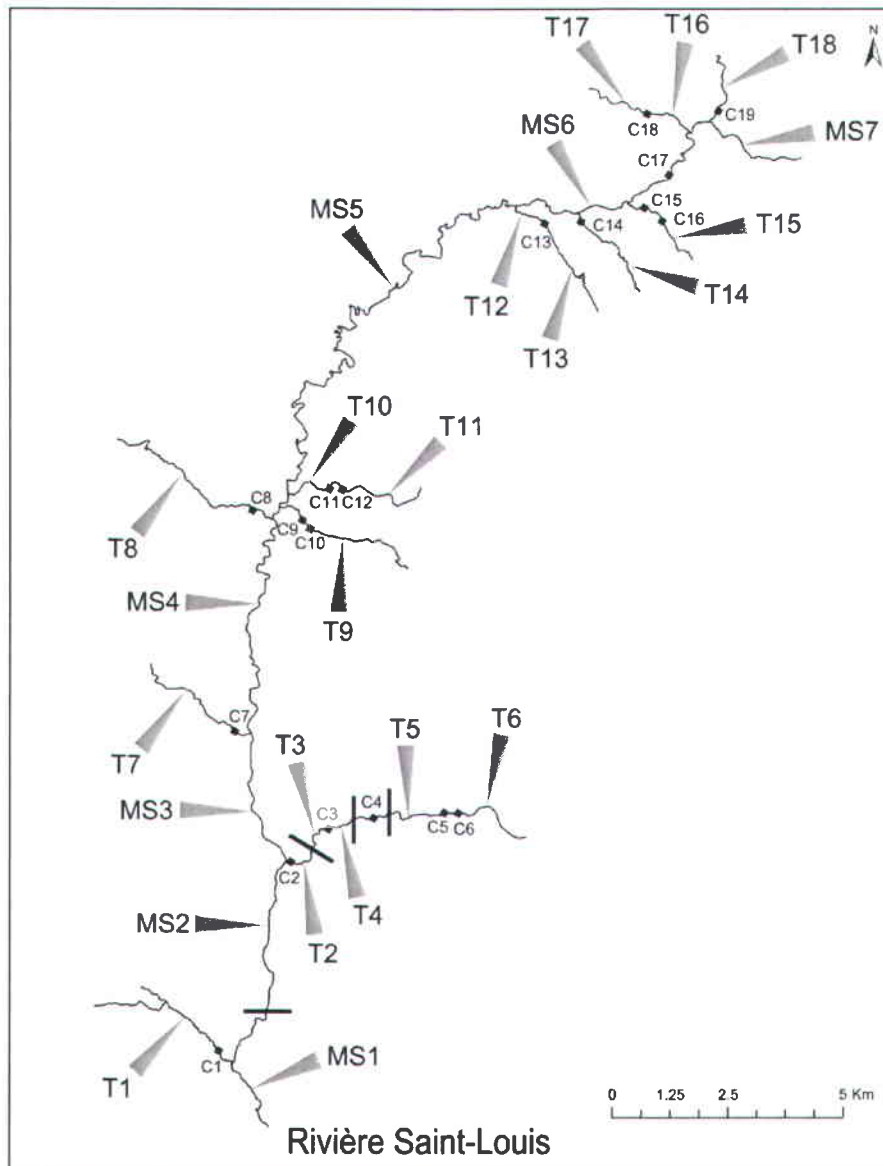


Figure 8 Localisation des sites d'échantillonnage; ponceaux (C); chutes naturelles (barres).MS : main stream; T : tributary

L'échantillonnage a été réalisé en été (Juillet 2012) par pêche électrique sur des sections de 150 à 200 m et a porté sur un total de 1000 individus à raison de 40 individus par site. Une attention particulière a été donnée à éviter l'échantillonnage d'individus juvéniles afin de prévenir les biais d'échantillonnage causés par le prélèvement d'individus issus de la même famille (Hansen et *al.* 1997). Pour chaque individu récolté, une biopsie de la nageoire adipeuse ou anale a été réalisée.

3.3. Génotypage

Pour chaque individu échantillonné, l'extraction d'ADN génomique s'est faite à partir de tissus de nageoires adipeuses ou anales selon la méthode d'extraction aux sels développée par Aljanabi et *al.* (1997). Cette méthode universelle offre l'avantage d'être simple, efficace, rapide et relativement peu onéreuse en comparaison à d'autres techniques d'extraction.

Le génotypage des individus a été réalisé à l'aide de 16 marqueurs microsatellites préexistants et a porté sur 38 à 40 individus par site (article, chapitre 2). Les microsatellites sont des petites séquences d'ADN, non codantes, réparties aléatoirement dans le génome. Ils correspondent à des répétitions nucléotidiques identiques allant de 2 à 4 paires de bases pour des allèles dont la taille varie généralement entre 100 et 400 paires de bases. On parle généralement de « séquences répétées en tandem » ou « SSR » (Simple Sequence Repeats). De par leur polymorphisme élevé (variation du nombre de motifs répétés) les microsatellites constituent des marqueurs moléculaires d'intérêt pour les études de génétique des populations (Powell et *al.* 1996).

3.4. Analyses

Dans un premier temps, les analyses ont consisté à mesurer les niveaux de diversité et de différenciation génétique au sein et entre les 25 localités échantillonnées. La mesure de la diversité génétique intra-sites a reposé sur le calcul de la richesse allélique et de l'hétérozygotie attendue pour chacun des sites tandis que les niveaux de différenciation inter-sites ont été évalués par le calcul des indices de fixation (F_{st} par paires). L'analyse de la structure génétique a par ailleurs été complétée par une analyse bayésienne de clustering individuel permettant de contrôler l'existence de populations distinctes ainsi que par une analyse de la variance moléculaire et une analyse factorielle des corrélations permettant de contrôler l'existence d'une structure génétique à un niveau hiérarchique inférieur (article, chapitre 2).

Dans un second temps, afin de documenter l'effet des ponceaux forestiers et des chutes naturelles sur la distribution de la diversité génétique dans le système étudié, des analyses multi-variées prenant en compte l'effet de différents facteurs environnementaux (Tableau 2) ont été conduites. Cette démarche s'inscrit dans une approche de génétique du paysage, discipline née de la fusion de la génétique des populations, de l'écologie du paysage et des analyses spatiales (Manel et *al.* 2003, Storfer et *al.* 2007), et permettant de tester l'influence relative de

différents facteurs sur les flux géniques et par conséquent d'identifier d'éventuelles barrières à ces derniers (Guillot et *al.* 2005, Holderegger and Wagner 2008). Dans ce cadre, une régression linéaire multiple a été conduite sur les valeurs de richesse allélique observées dans les 25 localités échantillonnées tandis qu'une régression multiple sur matrices de distances (Lichstein 2007) a été conduite sur les valeurs de *Fst* inter-sites. Deux modèles « généraux » ont ainsi été obtenus. Le choix des variables explicatives testées s'est fait au regard des résultats de plusieurs études scientifiques ayant démontrée l'influence de facteurs environnementaux variés sur les patrons génétiques de diverses espèces piscicoles (Frankham 1998, Carlsson et *al.* 1999, Castric et *al.* 2001, Raeymaekers et *al.* 2009).

Tableau 2 Variables explicatives testées sur les valeurs de richesse allélique et de *Fst*

Richesse allélique	<i>Fst</i> par paires
-Distance à l'exutoire	-Distance entre les sites
-Élévation	-Différence d'élévation
-Largeur du cours d'eau	-Différence de largeur de cours d'eau
-Nombre de ponceaux en aval	-Nombre de ponceaux entre sites
-Nombre de chutes naturelles en aval	-Nombre de chutes naturelles entre sites

Enfin, comme précisé dans l'article présenté en seconde partie, les deux modèles explicatifs « généraux » résultants de ces régressions ont été étendus afin de tester l'influence potentielle des caractéristiques physiques des ponceaux sur la distribution de la diversité génétique. Les valeurs moyennes et cumulées de pente, de hauteur et de longueur des ponceaux ont été ajoutées et testées comme variables explicatives. Pour de plus amples renseignements sur les critères de choix de variables et de sélection de modèles, le lecteur peut se référer à l'article scientifique présenté en seconde partie.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de cette étude témoignent d'une diversité génétique faible et spatialement hétérogène au sein du bassin versant étudié avec une valeur de richesse allélique moyenne de 7.35 (min = 4.82; max = 9.99) et une hétérozygotie attendue moyenne de 0.62 (min = 0.55; max = 0.70). Les valeurs de richesse allélique et d'hétérozygotie étaient généralement plus élevées vers l'aval du bassin versant (voir figure 2 de l'article), indiquant une influence de la position dans le bassin versant sur les niveaux de diversité génétique observés dans les localités échantillonnées. Ce gradient d'enrichissement génétique vers l'aval est un phénomène communément reporté dans la littérature pour différentes espèces piscicoles (Meldgaard et al. 2003, Hänfling and Weetman 2006, Raeymaekers et al. 2008, Blanchet et al. 2010) résultant du drainage passif des gènes vers l'aval dans les systèmes d'eau courante, les individus étant naturellement transportés dans le sens du courant. Différents résultats ont cependant mis en évidence une influence prépondérante de l'élévation sur les niveaux de diversité génétique avec des valeurs de richesse allélique et d'hétérozygotie fortement corrélées à l'altitude des sites échantillonnés (respectivement : $r = -0.82$, $P < 0.0001$ et $r = -0.70$, $P > 0.0001$). Comme souligné par Castric (2001), l'influence de l'élévation sur les niveaux de diversité génétique peut être expliquée par la probabilité accrue de la présence d'obstacles aux montaisons (chutes, rapides, débris) vers les sites les plus élevés, entraînant un isolement géographique plus important des populations. Les populations isolées sont par conséquent sujettes à des flux de gènes asymétriques ainsi qu'à un phénomène de dérive génétique accentué résultant en une perte de diversité génétique. Enfin, il convient de souligner que les deux valeurs de richesse allélique les plus faibles (4.82 et 5.52) ont été observées en amont de deux ponceaux jugés visuellement infranchissables en raison de leur obstruction et de hauteurs de chute importantes (article, chapitre 2), témoignant des conséquences d'une mauvaise installation ou d'un mauvais entretien de ces structures sur les flux de gènes vers les populations situées en amont.

Les analyses ont révélé l'existence d'une structure génétique à l'échelle du bassin versant avec un niveau de différenciation global moyen de 0.068, témoignant d'une structuration assez prononcée au regard de la faible étendue géographique du bassin versant étudié. Les plus forts niveaux de différenciation génétique inter-sites ($F_{st} \text{ max.} = 0.014$) ont été observés entre 4 sites échantillonnés en amont d'une série de chutes naturelles infranchissables et le reste des sites du bassin versant, des résultats indiquant que les flux de gènes sont limités par la présence de ces obstacles naturels. De telles observations ont été rapportées dans la littérature pour

différentes espèces de poissons (Wofford et al. 2005, Pritchard et al. 2007, Gomez-Uchida et al. 2009). Les analyses ont également permis de mettre en évidence que les sites séparés par des ponceaux étaient caractérisés par des niveaux de différenciation plus élevés, témoignant de flux de gènes limités par la présence de ponceaux. Ces résultats complètent des études antérieures reposant sur des techniques de capture-marquage-recapture et ayant démontré que les mouvements de différentes espèces de poissons sont restreints autour des ponceaux (Warren Jr and Pardew 1998, Benton et al. 2008).

L'analyse bayésienne de clustering individuel a permis de mettre en évidence l'existence de quatre clusters génétiquement et géographiquement distincts. L'un des clusters identifiés correspond au regroupement des 4 sites échantillonnés en amont des chutes naturelles infranchissables, des résultats démontrant là encore l'effet des barrières géomorphologiques sur les flux géniques entre localités. Les résultats de l'analyse de la variance moléculaire indiquent qu'il subsiste une variabilité à l'intérieur de chaque cluster génétique (variance intra-clusters de 2%), des résultats confirmés par l'analyse factorielle des correspondances et témoignant de l'existence d'une structure génétique à un niveau hiérarchique inférieur. L'ensemble de ces résultats indiquent que les ombles de fontaine du bassin versant étudié ont des mouvements relativement restreints, résultant en une structure génétique naturelle accentuée par la présence de barrières.

La régression linéaire multiple opérée sur les valeurs de richesse allélique a permis d'établir un modèle général expliquant 70% du niveau de richesse allélique observé dans les différents sites échantillonnés (R^2 ajusté = 0.70; $F_{2,22} = 29.44$; $P < 0.0001$). Parmi les cinq variables explicatives testées (distance, élévation, largeur de cours d'eau, nombre de ponceaux et de chutes naturelles en aval), le niveau d'élévation ainsi que le nombre de ponceaux situés en aval des sites sont les deux variables retenues dans le modèle général final sur la base du critère BIC (Schwartz and McKelvey 2009). Ces résultats confirment l'influence marquée de l'élévation et témoignent d'un effet significatif du nombre de ponceaux sur le niveau de diversité génétique. Ces résultats sont en accord avec des observations faites sur diverses espèces de poissons et portant sur d'autres types de barrières (passes migratoires, moulins seuils, barrages...) et indiquant un effet cumulatif des barrières sur les flux géniques vers les localités situées en amont (Meldgaard et al. 2003, Raeymaekers et al. 2008, Horreo et al. 2011). A notre connaissance, cette étude est la première à démontrer ce patron génétique pour les ponceaux. Par ailleurs, la régression linéaire multiple intégrant les caractéristiques physiques des ponceaux comme variables explicatives supplémentaires a permis d'établir un modèle étendu

légèrement plus explicatif (R^2 ajusté = 0.75; $F_{4,20} = 25.16$; $P < 0.0001$) intégrant l'élévation, le nombre de chutes naturelles ainsi que la hauteur cumulée comme variables explicatives finales. Ce modèle met donc en évidence que la hauteur cumulée des ponceaux est un meilleur prédicteur du niveau de richesse allélique des sites situés en amont que le nombre de ponceaux en tant que tel. Ce résultat indique que l'impact significatif des ponceaux sur la connectivité génétique est accentué par la présence de chutes à l'extrémité aval des ponceaux. L'effet des ponceaux et des chutes naturelles sur la distribution de la diversité génétique a été confirmé par la régression multiple sur les valeurs de F_{st} avec un modèle expliquant à 49% la différenciation génétique inter-sites (R^2 ajusté = 0.49; $F_{4,295} = 72.31$; $P < 0.0001$) et retenant les ponceaux ainsi que les chutes naturelles comme deux des quatre variables explicatives finales (distance, nombre de ponceaux inter-sites, nombre de chutes naturelles inter-sites et différence d'élévation entre sites). Comme précisé dans l'article, le modèle étendu intégrant les caractéristiques physiques de ponceaux n'étaient pas plus explicatif au regard du R^2 .

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Les résultats de ce projet de recherche témoignent d'un effet significatif des ponceaux et des chutes naturelles sur la distribution de la diversité génétique chez l'omble de fontaine. L'influence des chutes naturelles sur la connectivité génétique de différentes espèces piscicoles a déjà été démontrée par de nombreuses études scientifiques (Carlsson and Nilsson 2001, Wofford et al. 2005, Gomez-Uchida et al. 2009). En revanche cette étude est à notre connaissance, la première à démontrer l'effet des ponceaux sur la distribution de la diversité génétique chez l'omble de fontaine via une approche de génétique du paysage prenant en compte l'influence relative de différents facteurs environnementaux. Comme en témoignent les résultats de cette étude, les ponceaux entraînent, à l'instar des barrages (Neraas and Spruell 2001, Yamamoto et al. 2004, AIÒ and Turner 2005), des moulins (Raeymaekers et al. 2009) ou des passes migratoires (Meldgaard et al. 2003, Blanchet et al. 2010), l'apparition de discontinuités génétiques dans les milieux dendritiques résultant en un appauvrissement génétique des populations situées en amont ainsi qu'en une différenciation génétique accentuée entre ces dernières. Il est assez probable que des résultats comparables seraient observés dans d'autres bassins versants fragmentés par des ponceaux, faisant de cette étude un outil de gestion d'intérêt pour l'aménagement et la restauration des systèmes dendritiques fragmentés par des ponceaux.

Comme en témoignent les faibles niveaux de diversité génétique observés en amont des ponceaux jugés infranchissables, la mauvaise installation ainsi que le manque d'entretien de ces structures peuvent résulter en un appauvrissement génétique des populations situées en amont. Letcher et al. (2007) ont démontré que contre toute attente, des modifications démographiques locales (maturité sexuelle précoce, taux de survie plus élevé chez les juveniles) pourraient permettre la persistance des populations isolées, des résultats qui pourraient expliquer la présence d'ombles de fontaine dans tous les sites échantillonnés dans le bassin versant à l'étude, y compris en amont des chutes naturelles. Cependant, comme le souligne Letcher (2007), la survie des populations fragmentées n'est pas garantie pour autant et dépend avant tout de la « course » entre ces adaptations démographiques locales et la perte de diversité génétique résultant du phénomène de fragmentation. Bien que n'ayant identifié aucun tributaire où les ombles de fontaine sont absents, il convient de souligner qu'à longs termes, la perte de diversité génétique peut en effet résulter en une réduction du potentiel adaptatif des populations isolées et, ultimement, à des phénomènes d'extinction locale

(Yamamoto et al. 2004). Afin de conserver l'intégrité génétique des populations isolées, il semble par conséquent nécessaire de rétablir, dans le bassin versant étudié, mais également de manière générale, la connectivité entre les tributaires et les cours d'eau principaux. Ce besoin est d'autant plus criant pour les salmonidés pour qui les tributaires font partie intégrante du cycle de vie (Petty et al. 2005, Kanno et al. 2013). Par ailleurs, les résultats de cette étude ont démontré que la présence de chutes à l'extrémité aval des ponceaux accentuait potentiellement les effets négatifs de ces structures sur la connectivité génétique entre les localités. Il convient donc, lors de futurs plans de restauration, de porter une attention particulière à la présence de ponceaux suspendus dans les réseaux dendritiques. Aussi, il convient de souligner que la présence d'obstacles naturels aux flux de gènes, comme les chutes naturelles, doit être nécessairement appréciée lors de la mise en place de programmes de restauration. En effet, comme en témoignent différents résultats de cette étude, les chutes naturelles sont à l'origine de discontinuités génétiques, impliquant par conséquent que les ponceaux jugés problématiques et localisés à proximité immédiate de ces obstacles ne constituent pas nécessairement des sites d'interventions prioritaires.

Dans une étude publiée en 2010 (Blanchet et al. 2010) et portant sur d'autres types de barrières, il a été démontré que la sensibilité génétique à la fragmentation des habitats était variable selon les espèces. Il serait par conséquent intéressant, pour compléter l'étude présentée dans ce mémoire, de vérifier si de telles réponses « espèces-spécifique » sont observables suite au phénomène de fragmentation par les ponceaux. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que les caractéristiques physiques des ponceaux ont une influence sur le degré de connectivité génétique entre localités. Il serait donc nécessaire d'investiguer plus en profondeur cette question dans le cadre de futures études.

PARTIE 2 : ARTICLE

AVANT-PROPOS

L'article scientifique rédigé dans le cadre de ce projet de maîtrise et intitulé "Influence of forest road culverts and waterfalls on the fine scale distribution of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) genetic diversity in a boreal watershed" a été soumis pour publication dans la revue "Transactions of the American Fisheries Society" le 24 Janvier 2014.

Contribution de l'auteur et des co-auteurs

Jean-Baptiste Torterotot, candidat à la maîtrise en sciences de la terre à l'INRS ETE est le premier auteur de l'article. Il a par ailleurs participé et supervisé la campagne d'échantillonnage, a réalisé l'ensemble des analyses génétiques et statistiques relatives à cette étude.

Charles Perrier, stagiaire post-doctoral dans le laboratoire du professeur Louis Bernatchez et premier co-auteur sur la publication a participé à l'élaboration des objectifs de recherche, a également contribué à la définition d'une méthodologie et d'un design d'échantillonnage. Il a supervisé l'analyse des données. Il a par ailleurs été le principal réviseur de l'article au cours de sa rédaction.

Normand Bergeron, directeur de recherche de l'étudiant candidat et troisième co-auteur est à l'origine du projet de recherche. Il a participé à l'élaboration du projet ainsi qu'à la définition des objectifs de recherche. Il a également participé à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la révision finale de l'article.

Louis Bernatchez, co-directeur de l'étudiant candidat et dernier co-auteur sur la publication a participé à la définition des objectifs de recherche ainsi qu'à l'interprétation des résultats et à la révision finale de l'article. Par ailleurs toutes les analyses génétiques ont été réalisées dans le laboratoire du professeur L. Bernatchez au département biologie de l'université Laval.

RÉSUMÉ

Cette étude visait à documenter et à comparer l'impact génétique des barrières naturelles et anthropiques sur la distribution de la diversité génétique chez l'omble de fontaine à l'échelle du bassin versant. Afin de répondre aux objectifs de recherche, 996 individus ont été échantillonnés dans 25 sites au sein d'un bassin versant boréal fragmenté par des ponceaux forestiers et des chutes naturelles. À l'aide d'une approche de génétique du paysage, nous avons testé si la présence de barrières naturelles et anthropiques résultait en une réduction de la diversité génétique ainsi qu'en une accentuation de la différenciation génétique des populations isolées. Les résultats de l'étude mettent en évidence une différenciation génétique accentuée entre les sites séparés par des barrières (ponceaux et/ou chutes naturelles) ainsi qu'une diversité génétique plus faible dans les populations isolées. Par ailleurs, les résultats de cette étude suggèrent un effet comparable des ponceaux et chutes naturelles sur les indices génétiques mesurés avec un effet des ponceaux toutefois globalement plus prononcé. Par ailleurs, comme en témoignent les résultats, les indices de diversité et de différenciation génétique étaient positivement corrélés au nombre de barrières situées à l'aval ou entre les stations d'échantillonnage, suggérant un effet cumulatif des barrières sur les flux de gènes au sein du bassin versant à l'étude.

A notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence l'effet des ponceaux forestiers et des chutes naturelles sur la distribution de la diversité génétique de l'omble de fontaine au sein d'un bassin versant boréal. Nous discutons nos résultats dans le contexte de l'actuelle expansion humaine vers les régions boréales, au regard de la nécessité d'une meilleure compréhension de l'impact potentiel des infrastructures de transport engendrées par ces développements sur la pérennité des espèces piscicoles.

ABSTRACT

Habitat fragmentation has become an increasing concern in conservation biology and is of prime importance with the expansion of forest-road networks toward boreal and arctic regions. The aim of this study was to evaluate the effect of artificial and natural barriers to fish movement on the fine scale distribution of genetic diversity in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). We genotyped 996 individuals sampled from 25 locations in a boreal watershed fragmented by culverts and natural waterfalls. Using a landscape genetic approach, we tested whether the presence of both types of barriers resulted in decreased genetic diversity and increased divergence within isolated locations. Results showed that genetic divergence was enhanced between sites separated by barriers and genetic diversity was reduced within sites located above barriers. Moreover, the changes observed in the levels of divergence and diversity correlated with the number of barriers. Overall, results of this study suggested that the effects of culverts and natural waterfalls were similar but the effect of culverts was globally more pronounced. To our knowledge, this is the first study illustrating the effects of forest-road culverts and natural waterfalls on the distribution of genetic diversity in brook charr within a boreal watershed. We discuss our results in the context of boreal forest-road network expansion and in light of the necessity for a better understanding of the potential impact of road infrastructure on long-term fish population persistence.

Influence of forest road culverts and waterfalls on the fine scale distribution of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) genetic diversity in a boreal watershed.

Accepted for publication in « *Transactions of the American Fisheries Society* » on 17 July 2014.

Jean-Baptiste TORTEROTOT¹⁻², Charles PERRIER³, Normand E. BERGERON¹⁻², Louis BERNATCHEZ³

¹ Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), centre Eau-Terre-Environnement (ETE), Québec, Canada.

² Groupe de Recherche Interuniversitaire en Limnologie et en Environnement Aquatique, Montréal, Canada

³ Département de Biologie, Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, Canada

Corresponding author: jeanbaptiste.torterotot@gmail.com

Effet des ponceaux forestiers et des chutes naturelles sur la distribution de la diversité génétique de l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) au sein d'un bassin versant boréal.

Accepté pour publication dans la revue « *Transactions of the American Fisheries Society* » le 17 Juillet 2014.

**Jean-Baptiste TORTEROTOT¹⁻², Charles PERRIER³, Normand E. BERGERON¹⁻²,
Louis BERNATCHEZ³**

¹ Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), centre Eau-Terre-Environnement (ETE), Québec, Canada.

² Groupe de Recherche Interuniversitaire en Limnologie et en Environnement Aquatique, Montréal, Canada

³ Département de Biologie, Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, Canada

Contact : jeanbaptiste.torterotot@gmail.com

1. INTRODUCTION

With the expansion and intensification of land conversion for human activities, habitat fragmentation has become an increasing concern in conservation biology (Fagan 2002; Vitousek et al. 2008). This landscape-level phenomenon (McGarigal et al. 2002) can be described as the disruption of continuous habitats into smaller habitat patches isolated from each other by a matrix of dissimilar habitats (Fahrig 2003; Wilcove et al. 1986). From a biological perspective, such spatial rearrangement results in the geographical separation of small local populations whose stability and persistence depend on the quality, extent and connectivity of remaining habitats (Groom et al. 2005; Levins 1969). For most species, habitat fragmentation results in patch size reduction and in partial or complete isolation of populations (Fahrig 2003). Decrease in connectivity and reduction of patch size have been linked to a variety of negative ecological consequences (Collinge 1996), from alteration of dispersal behavior (Mader 1984; Schtickzelle et al. 2006; Stow et al. 2001) to decrease in species richness and abundance (Andrén 1994; Coudrain et al. 2013; Hinsley et al. 1996). With pervasive ecological impacts on both terrestrial and aquatic ecosystems, habitat fragmentation is considered to be one of the most serious threats to biodiversity (Fagan 2002; Fahrig 2003; Hanski 1999; Zwick 1992).

From a population genetics perspective, numerous studies have demonstrated that breaks in connectivity resulting from habitat fragmentation can modify the genetic structure and diversity of a variety of organisms including mammals (Epps et al. 2005), birds (Harrisson et al. 2012), invertebrates (Keller et al. 2004) and fishes (Morita et al. 2009). However, empirical studies demonstrated that genetic sensitivity to habitat fragmentation was variable among species and mainly conditioned by their dispersal abilities (Blanchet et al. 2010; Debinski and Holt 2000). With respect to predictions from metapopulation theory (Levins 1969) and population genetics principles, habitat fragmentation may result in reduced gene flow between fragmented patches, hence increasing the level of genetic differentiation among remnant populations by accentuated genetic drift (Templeton et al. 1990; Yamamoto et al. 2004; Young et al. 1996). Moreover, patch size reduction may in turn lead to a decrease of effective population size, increased inbreeding and loss of genetic diversity which may ultimately lead to higher risk of extinction (Couvét 2002; Dixo et al. 2009; Hanski 1999).

Road construction ranks among the main sources of habitat fragmentation with potential negative ecological and genetic consequences on terrestrial and aquatic communities (Coffin 2007; Forman and Alexander 1998; Trombulak and Frissell 2000). Roads thus act as total or

partial barriers to individual dispersal and gene flow in many taxa including amphibians (Lesbarrères et al. 2006; Vos and Chardon 1998), invertebrates (Keller et al. 2004), and both large and small mammals (Epps et al. 2005; Oxley et al. 1974). However, little attention has been given to fish communities and to the potential genetic impacts of stream-crossing structures such as culverts induced by the construction of roads in riverine landscapes. When poorly installed or maintained culverts can become barriers to fish movement (Warren & Pardew 1998) due to outlet drops exceeding fish jumping abilities, excessive water velocities and/or accumulation of debris in the structure. The lack of knowledge about the genetic impacts of culverts is surprising considering that several studies have already reported negative impacts of culverts on fish distribution (Pépino et al. 2012; Wheeler et al. 2005) and dispersal (Benton et al. 2008; Gibson et al. 2005; Park 2008; Warren and Pardew 1998). Despite the relevance of these observations and their possible negative consequences for fish population persistence, to our knowledge no previous work has been conducted concerning the genetic consequences of habitat fragmentation by culverts.

In this study, we aimed to document the impact of forest-road culverts on the fine scale distribution of genetic diversity in a wild resident brook charr (*Salvelinus fontinalis*) population inhabiting a small North-American boreal watershed. A report from 2002 for the Québec Ministry of Natural Resources and Wildlife (Prévost et al. 2002) estimated that the expansion of forest-road networks linked to forestry and mining activities involves the installation of more than 10 000 stream-crossing structures per year in the province of Quebec alone. In the light of such figures and considering the lack of knowledge about the possible consequences of these infrastructures on fish population persistence, there is a need for a better understanding of the potential genetic impacts of habitat fragmentation induced by forest-road culverts. This is even more compelling in the light of current economic and development programs, which involves the building of new transportation infrastructure in riverine landscapes, particularly so in boreal regions.

Brook charr is a salmonid native to eastern North America (MacCrimmon et al. 1971) which is sensitive to habitat fragmentation (Letcher et al. 2007; Whiteley et al. 2013). We addressed the hypothesis that, acting as partial or complete barriers to fish dispersal, culverts can affect the distribution of genetic diversity within brook charr populations as reported for dams (Yamamoto et al. 2004), weirs (Meldgaard, Nielsen et al. 2003; Blanchet et al. 2010) or mills (Raeymaekers et al. 2009) in other fish species. We predicted lower genetic diversity in locations upstream of culverts and increased genetic differentiation among sites separated by culverts. Although

culverts may affect dispersal and gene flow among fish populations, waterfalls may also affect fish movement (Carlsson *et al.* 1999; Castric *et al.* 2001). It is therefore important to estimate to what extent culverts affect brook charr taking into account the presence of natural potential barriers to dispersal such as waterfalls but also other key riverscape variables (Ward 1998) such as elevation, channel width, or waterway distance which have been shown to impact the distribution of genetic diversity in salmonids and other fishes (Castric *et al.* 2001; Gomez-Uchida *et al.* 2009; Hebert *et al.* 2000; Kanno *et al.* 2011; Neville *et al.* 2006; Raeymaekers *et al.* 2008).

Using a landscape genetics approach (Manel *et al.* 2003) accounting for the effects of anthropogenic and natural factors on the distribution of genetic diversity in brook charr populations, we estimated both genetic diversity within and genetic differentiation among twenty five sampling locations within a boreal watershed to address the following questions: i) Does a fine scale population structure exist in the study watershed? ii) What are the main riverscape variables associated with the genetic diversity and differentiation observed within the watershed? iii) What is the effect of the number of culverts and waterfalls on the observed distribution of genetic diversity? And iv) Do the physical characteristics of culverts have an effect on the distribution of genetic diversity? We then discuss the implications of these results on management strategies and restoration programs in dendritic riverine networks fragmented by culverts.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study site

This study was conducted in the watershed of the Saint-Louis River, a small boreal watershed in central Québec, Canada (Fig. 1; study site encompasses 48°48' N, 70°53' W and above). Brook charr is the principal species inhabiting the Saint-Louis River and its tributaries. The Saint-Louis River has a drainage area of 239 km² and an average wetted width of 25 m; its tributaries have an average wetted width of 3 m. The area was dominated by logging activities during the last four decades or so, resulting in a notable expansion of the forest-road network and in the installation of numerous culverts throughout the watershed. During the summer of 2011, we surveyed the watershed to identify all natural and artificial potential barriers to fish movement and gene flow. The height of natural waterfalls and the physical characteristics of each culvert were measured: slope, length and outlet drop height. The outlet drop height was measured as the distance between the outlet lowest edge of culvert and the water surface of the downstream pool.

2.2. Fish sampling

Fish sampling was designed in order to statistically evaluate the potential effects of natural waterfalls and a subset of nineteen culverts on the spatial distribution of genetic diversity (Figure 1). An attempt was made to select widely distributed culverts comprising a wide variety of physical characteristics (Table 1) to evaluate the relative influence of these characteristics on the observed spatial genetic patterns. Brook charr were electro-fished in 25 locations throughout the entire watershed in July 2012 (Figure 1, Table 2). Seven sites were chosen within the main stream (MS1 to MS7), fifteen sites on tributaries above barriers (culverts and/or waterfalls) (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T11, T13, T14, T15, T17, T18) and three sites on tributaries below barriers (T10, T12, T16).

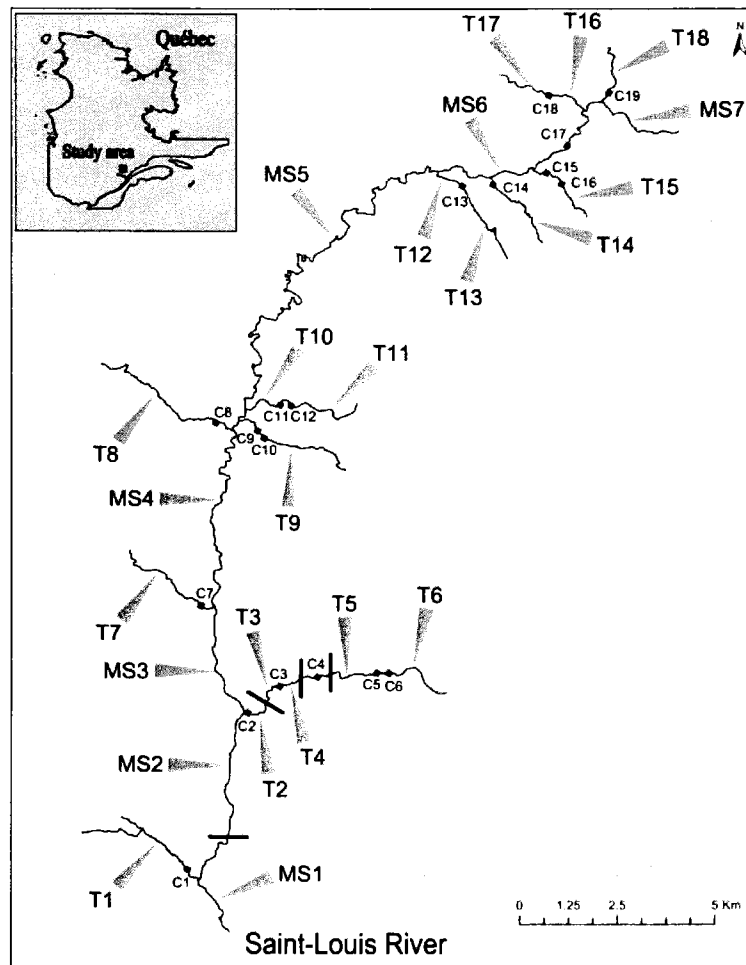


Figure 1 Locations of the twenty five sampling sites in the Saint-Louis River watershed, Québec, Canada. Black squares represent culvert (n = 19), solid bars represent impassable waterfalls (n = 4). Locations codes are given in Table 2. Key to abbreviations: MS, mainstream; T, tributary, C, culvert

For each sampling location, elevation (meters above sea level) and channel width were recorded. An effort was made to follow the recommendations of Hansen et al. (1997) to prevent the sampling of closely related individuals by avoiding collecting young of the year fish as well as by spreading the sampling effort over long river sections. In total, 996 brook charr were electrofished, weighed and measured for fork length. The number of fish per site varied from 38 to 40 (Table 2). A small piece of tissue, either adipose or anal fin, was clipped of from each individual and stored in 95% ethanol.

2.3. Genotyping

DNA was extracted from fin tissue using the salt extraction method described by Aljanabi and Martinez (Aljanabi and Martinez 1997). Amplification by PCR was realized at sixteen microsatellite loci: *SfoB52*, *SfoC24*, *SfoC28*, *SfoC86*, *SfoC88*, *SfoC113*, *SfoC129*, *SfoD75*, *SfoD91*, *SfoD100*, *SfoD105*, (T. L. King, US Geological Survey, unpublished data), *Sfo23* (Angers et al. 1995), *Sfo226*, *Sfo266*, *Sfo269*, *Sfo308* (Perry et al. 2005). PCR products were electrophoresed on an ABI 3100 automated capillary sequencer (Applied Biosystems). Alleles were scored with GeneMapper™. Genotypes were checked for scoring errors arising from stutter products and large allele dropout using Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004).

2.4. Analysis of the distribution of genetic diversity

The genetic diversity within sampling sites was quantified in terms of allele number and allelic richness using FstAT 2.9.3.2 (Goudet 1995). The expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity and the presence of private alleles were calculated with GENETIX 4.05.2 (Belkhir et al. 2000). The inbreeding coefficient (F_{IS}) was used to measure deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and was estimated for each sampling site and each locus using FstAT.

The differentiation among sampling sites was quantified by pairwise F_{ST} values calculated in FstAT. Statistical significance of pairwise F_{ST} values were tested using 1,000 permutations and P-values were adjusted using the sequential Bonferroni technique (Rice 1989) implemented in FstAT.

The program BAPS (Corander et al. 2003) was used to identify clusters of genetically related individuals and to detect migrants and admixed individual among the genetic clusters identified in the Saint-Louis River watershed. BAPS is a Bayesian genotypic clustering model that allows the simultaneous identification of genetically differentiated populations (clusters) and the assignation of individuals to populations from individual multilocus genotypes. This program also allows the quantification of individual admixture proportions (individual q-values) using in a two-tiered approach: once the clustering solutions are determined, the admixture of individual genotypes can be then estimated by establishing the clusters from which an individual's alleles originate. BAPS was therefore first used to cluster groups of individuals, testing for a number of

clusters (k) from 1 to 20. An admixture model was then used to identify migrants and admixed individuals. Admixture model settings were as follows: 150 iterations to estimate the admixture coefficients for individuals, 50 reference individuals from each cluster, 15 iterations to estimate the admixture among individuals. With respect to previous publications (Lecis *et al.* 2006; Bergl *et al.* 2007; Vähä and Primmer 2006), individuals were classified as local, migrant and admixed when their individual admixture proportions of the local cluster were, respectively, > 0.80 , < 0.20 , and $[0.20 \text{ and } 0.80]$.

GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2000) was used to compute a multi-dimensional Correspondence Factorial Analysis (CFA). The ARLEQUIN 3.5 program (Excoffier and Lischer 2010) was used for analysis of molecular variance (AMOVA) among the genetic units identified by BAPS.

2.5. Riverscape genetics

The potential influence of several riverscape variables on genetic differentiation between sampling sites and on genetic diversity within sites was tested using the following statistical methods. First, linear regressions were conducted to independently test the correlations between watershed position, site elevation, channel width, degree of habitat fragmentation, and genetic diversity, namely allelic richness (AR) and heterozygosity (HE). Watershed position was measured as the streamwise distance from the most downstream sampling site using ESRI® ArcGIS 10.0 (ESRI 2011) and the degree of habitat fragmentation was considered as the number and type of barriers located downstream of each sampling location. The strength of the linear correlation between each explanatory variable and the response variable was measured using the Pearson coefficient of determination. All regressions were conducted and tested in R (R Development Core Team 2010).

A multiple linear regression was then performed in order to accurately disentangle the effect of the above-mentioned riverscape variables on genetic diversity in term of mean allelic richness per site. A model selection by exhaustive search based on the Schwarz Bayesian information criterion (BIC) (Schwarz 1978, Excoffier and Lischer 2010) was conducted using the R package LEAPS (Lumley and Miller 2009). Multi-collinearity among variables was tested using the variance inflation factor (VIF) implemented in the R package CAR (Fox and Weisberg 2011). Variables with a $VIF < 10$ were retained in the final model (Neter *et al.* 1996.). Residuals were tested for normality and heteroscedasticity. Statistical significance of final predictors was accepted at $\alpha = 0.05$.

Mantel tests (Mantel 1967) and multiple regression on distance matrices (MRDM) (Lichstein 2007) were used to measure the effect of riverscape variables on genetic differentiation between sampling sites ($n = 300$ pairwise combinations). Essentially, the Mantel test examines the correlation between a dependent and a predictor matrix whereas MRDM simultaneously examines the effect of a group of predictor matrices on the dependent matrix. Statistical significance was evaluated by permutations. To test for isolation by distance (IBD) (Wright 1943), the Mantel test was performed between pairwise F_{st} values and pairwise streamwise distances. Streamwise distances between pairs of sampling sites were calculated using the Network Analyst tool implemented in ArcGIS 10.0. In order to disentangle the effect of river distance and fragmentation, the dataset was split into two different groups to test IBD on barrier-separated sites and on sampling sites located on continuous reaches. Mantel tests were also used to test the correlation between the number and types of barriers between sites, pairwise differences in channel width, pairwise differences in sampling site elevation and the response matrix of pairwise F_{st} values. Multiple regressions on distance matrices were conducted to simultaneously test the relative correlation of all aforementioned variables with the pairwise F_{st} matrix. The model selection was based on the minimization of the Schwarz Bayesian information criterion (BIC) and the statistical significance of explanatory variables was accepted at $\alpha = 0.05$. Mantel tests and MRDM were performed using the ECODIST package (Goslee and Urban 2007) in R and statistical significance for both analyses was obtained after 10,000 permutations.

Finally, following the method of Raeymaeker et al. (Raeymaekers et al. 2008), the models obtained from the two multiple regressions described above were extended to more accurately assess the relative effect of culvert physical characteristics on genetic diversity within sites and genetic differentiation between sites. Detailed culvert characteristics were added to the dataset and tested as explanatory variables, namely the cumulative and mean height of outlet drops, cumulative and mean slope and cumulative and mean length of culverts.

3. RESULTS

3.1. Barriers characteristics

One waterfall is a long bedrock cascade located on the downstream part of the Saint-Louis River, isolating the upper portion of the drainage network. The other waterfalls are a series of three bedrock falls (from 2 m to 7 m) located on a small tributary in the lower part of the watershed. Apart from a few exceptions, all selected culverts lie at the confluence of tributaries and the main stream (Figure 1). All but two of the selected culverts (C8 & C16, Table 1) were circular metallic pipes whose length ranged from 7.2 m to 30 m. The slope of the selected culverts ranged from 0.10 % to a maximum of 7.00 % for culvert C6. Six of the nineteen selected culverts, referred as “hanging culverts” in above sections, presented outlet drops ranging from 0.15 m to a maximum of 1.17 m for culvert C14. Furthermore culvert C18 was obstructed by woody debris and sediments.

Table 1 Physical characteristics of the nineteen culverts retained for the study

Culvert ID	Length (m)	Slope (%)	Drop height (m)	Comments
C1	7.2	1.7	-	
C2	9.0	1.8	-	
C3	13.5	2.9	-	
C4	11.9	1.4	-	
C5	9.1	5.2	0.15	
C6	30.0	7.0	-	
C7	18.2	2.1	0.26	
C8	2.0	0.1	-	wood culvert
C9	18.2	2.4	-	
C10	13.2	1.0	0.48	
C11	18.3	0.9	0.34	
C12	10.0	1.1	-	
C13	18.5	2.2	-	
C14	24.6	3.7	1.17	
C15	14.6	1.6	-	
C16	2.0	0.1	-	wood culvert
C17	18.2	0.1	-	
C18	13.9	6.6	0.56	obstructed
C19	18.4	3.9	-	

3.2. Analysis of the distribution of genetic diversity

On the basis of Hardy–Weinberg equilibrium proportions, 2 of the 16 microsatellite markers tested were rejected. Indeed, loci *SfoC24* and *SfoC129* exhibited significant F_{IS} in 10 sampling locations. However, based on Micro-Checker 2.2.3 analyses, no evidence of null alleles or large allele drop-out was found at any markers. Genotypes were thus obtained for 996 individuals (38 to 40 individuals per site, Table 2), for the 14 loci retained, with an amplification success of 99.98%.

Table 2 Sampling locations in the Saint-Louis River basin and description of sampling characteristics: sample size (n), allelic richness (A_R) (standardized for 38 individuals), unbiased expected heterozygosity (H_E), number of private alleles (P_A)

Sample name	Latitude (°N)	Longitude (°W)	n	A_R	H_E	P_A
MS1	48°36'27.4"	70°56'12.6"	40	9.78	0.69	13
MS2	48°37'21.5"	70°55'43.2"	40	8.20	0.62	0
MS3	48°40'18.7"	70°56'06.0"	40	9.15	0.66	0
MS4	48°43'03.3"	70°55'37.4"	40	8.47	0.63	0
MS5	48°45'40.1"	70°53'29.4"	40	8.12	0.63	1
MS6	48°46'32.5"	70°50'28.4"	39	6.71	0.61	0
MS7	48°47'36.4"	70°48'07.6"	40	7.26	0.61	0
T1	48°38'58.5"	70°55'21.1"	39	9.99	0.70	9
T2	48°38'58.0"	70°55'18.9"	40	8.68	0.67	0
T3	48°39'11.9"	70°54'58.1"	38	6.43	0.59	1
T4	48°39'24.2"	70°54'28.7"	40	6.83	0.61	0
T5	48°39'32.2"	70°53'36.5"	40	7.05	0.60	0
T6	48°39'29.4"	70°53'19.8"	40	6.53	0.59	2
T7	48°40'28.2"	70°56'17.2"	40	7.36	0.59	2
T8	48°42'59.2"	70°55'50.5"	40	7.70	0.64	1
T9	48°42'55.4"	70°54'55.8"	40	6.65	0.64	0
T10	48°43'15.8"	70°55'20.8"	40	7.51	0.63	0
T11	48°43'24.0"	70°55'11.5"	40	7.72	0.63	0
T12	48°46'31.3"	70°51'18.8"	40	7.08	0.64	0
T13	48°46'24.1"	70°50'56.5"	40	7.63	0.65	0
T14	48°46'27.8"	70°50'19.1"	40	5.52	0.55	0
T15	48°46'35.5"	70°49'17.5"	40	6.28	0.58	2
T16	48°47'33.4"	70°48'30.9"	40	6.07	0.60	0
T17	48°47'38.1"	70°47'59.8"	40	4.82	0.56	0
T18	48°47'30.5"	70°48'26.3"	40	6.17	0.61	0

Allelic richness and expected heterozygosity were variable among sampling locations (Figure 2, Table 2 & Appendix I). Over all locations, 6 to 38 alleles were observed per locus, with an average of 15.14 alleles per locus. Mean allelic richness per location was 7.35 on average and ranged from 4.82 (T17) to 9.99 (T1). It is noteworthy that the lowest levels of A_R were observed in sites T14 (5.52) and T17 (4.82) located above the highest hanging culvert identified in the watershed (C14) (Table S1) and above a hanging and obstructed culvert (C18), respectively.

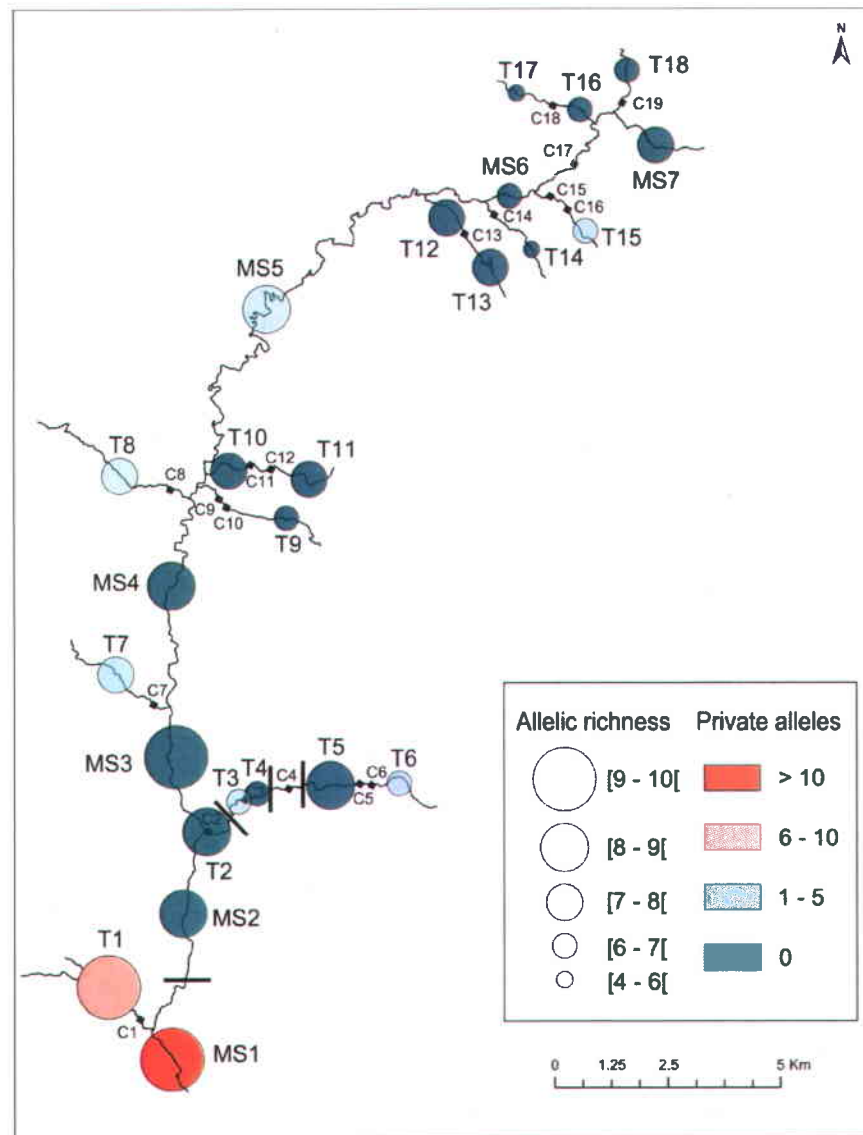


Figure 2 Geographical repartition of allelic richness and private alleles among the twenty-five sampling locations

The highest diversity was observed in site T1, the most downstream sampling site in the watershed. Mean expected (H_E) heterozygosity per location ranged from 0.55 (T15) to 0.70 (T1) (Annexe I). A total of 31 private alleles were found for 11 of the 14 loci analyzed; 22 of these private alleles were observed in the two sampling sites MS1 and T1 located downstream of the impassable waterfall situated on the lower part of the Saint-Louis River (Figure 2; Table 2).

Pairwise *Fst* values ranged from 0.001 (between T4 and T3, MS2 and MS3, MS2 and MS4, MS2 and MS5, MS3 and MS5) to 0.144 (between T6 and T14) (Annex II) and overall genetic differentiation was 0.068. Significant genetic differentiation was detected in 263 of 300 pairwise comparisons after Bonferroni correction. The mean pairwise *Fst* value for sampling sites separated by barriers (culverts or waterfalls) was significantly higher (0.055) than the mean pairwise *Fst* for sampling sites pairs located on continuous river sections (0.017 ; Mann Whitney $P < 0.01$) providing a first indication of the influence of barriers on the level of genetic differentiation between sampling locations. A comparable result was obtained when removing the possible influence of waterfalls by considering sites separated by culverts only. Particularly high *Fst* values were found between T3, T4, T5 and T6 located above a series of major waterfalls, and all other sampling locations in the watershed (mean overall *Fst* = 0.097). We also observed particularly high *Fst* values between T17, located above an obstructed culvert (C18) (Figure 1; Table 1) and the remaining sampling locations (mean overall *Fst* = 0.092). In contrast, *Fst* was low and often non-significant among sites sampled on the Saint-Louis River (mean *Fst* = 0.013) suggesting more pronounced gene flow and/or lower genetic drift within the main stream.

The Bayesian clustering performed with BAPS identified four distinct genetic clusters whose distribution showed a clear geographical pattern in the Saint-Louis River watershed (Figure 3). A first genetic cluster (yellow cluster in Figure 3) was associated with the four sampling sites T3, T4, T5 and T6 located above a series of impassable waterfalls. A second genetic cluster (red cluster in Figure 3) was observed in a headwater tributary and comprised sites T16 and T17 sampled on either sides of culvert C18. As mentioned above, the highest pairwise *Fst* values were associated with sampling sites located between these two clusters. Pairwise *Fst* was however low among sampling sites within these two clusters (mean pairwise *Fst*: 0.024 and 0.009 respectively). The third cluster (blue cluster in Figure 3) encompassed most sampling sites located on the main stream MS1, MS2, MS3, MS4, MS5 and sampling sites T1, T2, T7, T8, T9, T10, T11, T13. The fourth cluster (green cluster in Figure 3) comprised sampling sites T12, T14, T15, T18, MS6 and MS7. Genetic differentiation within these two clusters was relatively low (mean pairwise *Fst* = 0.021 and 0.024 respectively). At the population level, low level of

admixture was detected with only few putative migrants from neighboring clusters identified in sampling sites T2, T12, T13, T16, MS2, MS5 and MS6, further illustrating reduced gene flow among clusters. Little evidence of upstream migration above barriers was suggested by the low proportion of putative migrants or admixed individuals detected in sampling sites located upstream of barriers.

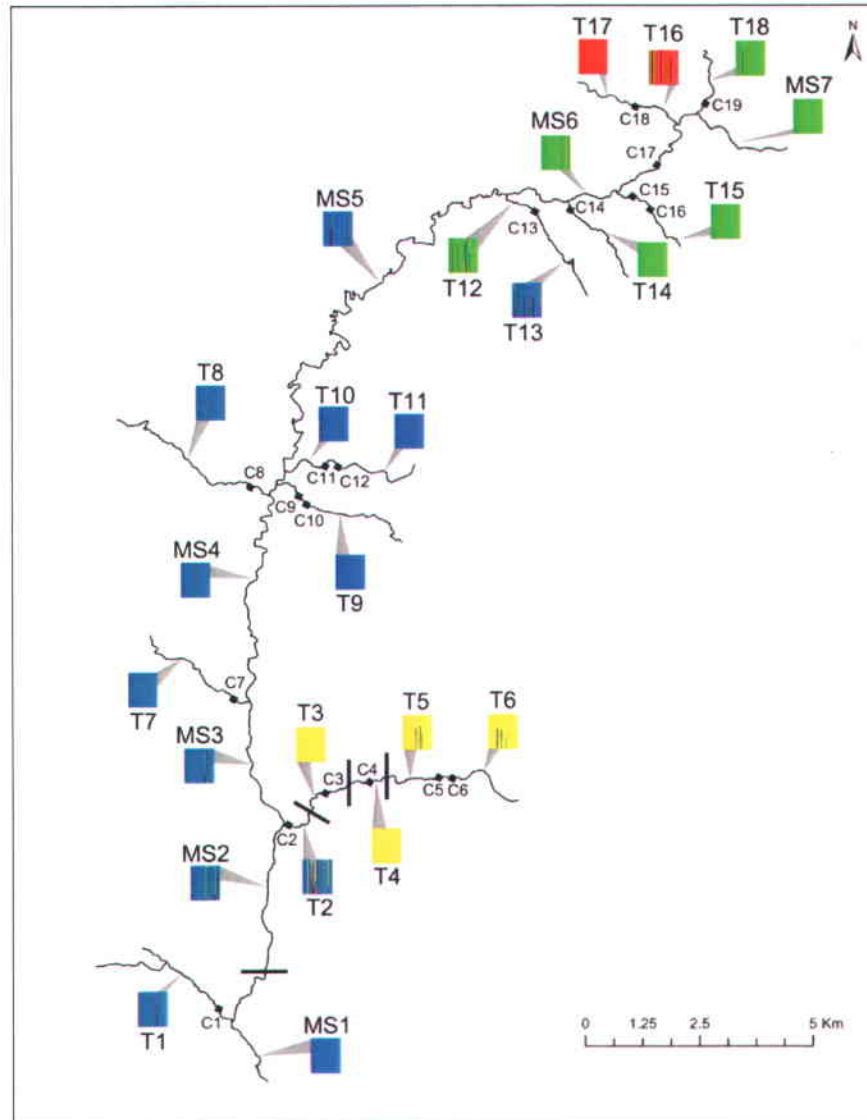


Figure 3 Bayesian individual clustering results with BAPS

The CFA (GENETIX) confirmed the genetic structure found by BAPS (Figure 4) with four distinct genetic groups being defined. According to the first axis, the yellow cluster obtained from BAPS was clearly discriminated from other clusters. The second axis discriminated the three other clusters identified by BAPS. The CFA further revealed that a modest genetic differentiation exists among locations within clusters delineated by BAPS. In particular, locations MS1 and T1 within the blue cluster appeared to be differentiated from other locations contained within this cluster according to the third axis.

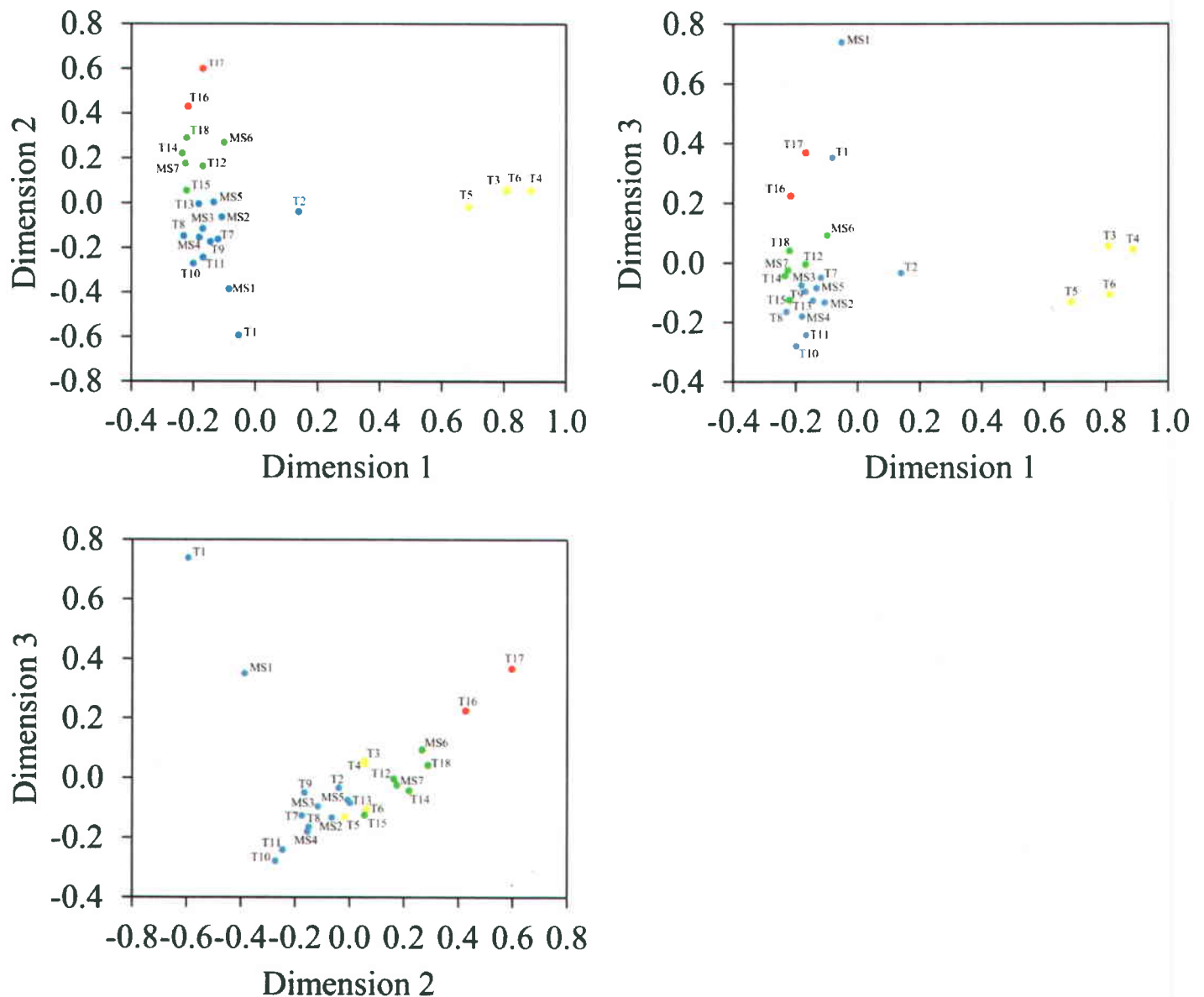


Figure 4 Correspondence factor analysis illustrating genetic distances among locations. The first three axes are represented. Colors corresponds to the colors used to illustrate the 4 clusters delineated by BAPS

Overall, the AMOVA revealed that 4.79% of the total genetic variance was found among clusters identified by BAPS software whereas 2.00% of the variance was found among samples within clusters (Table 3).

Table 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) partitioning genetic variance among groups identified by BAPS, among populations within groups and within populations

Source of variation	Percentage of variance	F-statistics [5% - 95%]	P-values
Among groups	4.79	$F_{ct} = 0.048$ [0.035-0.060]	< 0.0001
Among populations within groups	2.00	$F_{sc} = 0.021$ [0.018-0.023]	< 0.0001
Within populations	93.21	$F_{st} = 0.068$ [0.055-0.080]	< 0.0001

3.3. Riverscape genetics

Allelic richness (A_R) was negatively correlated with river distance to the most downstream sampling site ($r = -0.65$; $P = 0.0003$), with higher A_R observed in downstream locations (Table 4, Figure 2). A similar pattern was observed for expected heterozygosity ($r = -0.49$, $P = 0.0123$) which decreased with river distance from the most downstream location. A negative correlation was also observed between A_R and the number of barriers located downstream of the sampling site ($r = -0.45$; $P = 0.0238$). This relationship was higher and more significant for culverts ($r = -0.44$; $P = 0.0262$) than for waterfalls ($r = -0.37$; $P = 0.0819$) suggesting a more pronounced effect of culverts on the observed genetic diversity among sampling locations. As revealed by our analyses, sampling sites located at higher elevation in the watershed were characterized by lower A_R ($r = -0.82$; $P < 0.001$) and lower levels of H_E ($r = -0.70$, $P < 0.0001$). Finally, A_R ($r = 0.59$; $P < 0.0001$) and H_E ($r = 0.41$, $P = 0.0610$) tended to increase with channel width.

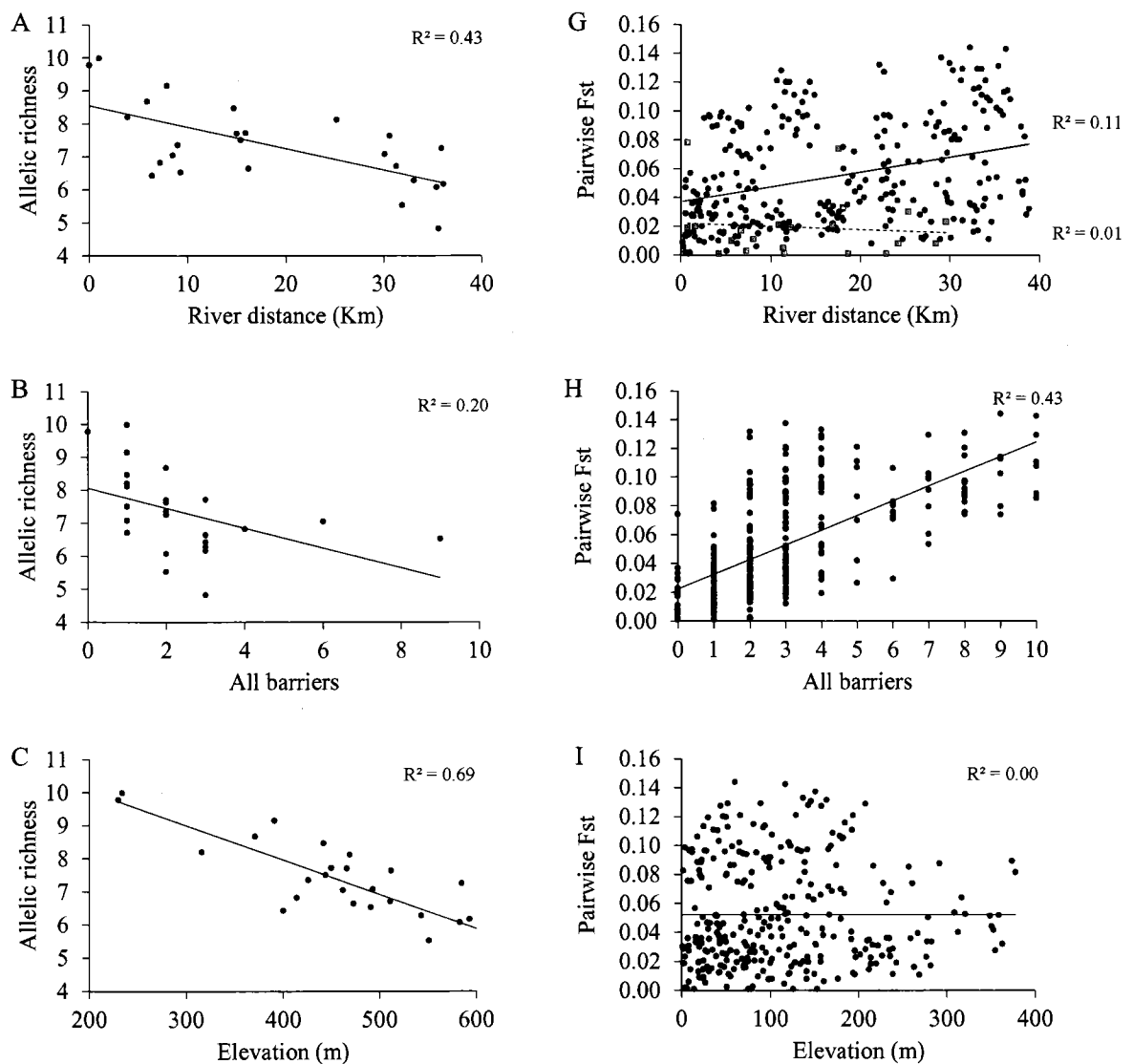
Table 4 Correlations of landscape variables with genetic diversity (AR) and genetic differentiation (*Fst*) obtained from the 25 sample locations in the Saint-Louis River basin. Pearson correlations (*r*) of geographical features with allelic richness (A); Mantel matrix correlations (*r_m*) of pairwise geographical features with pairwise *Fst* (B)

Geographical feature	(A) AR	(B) Pairwise <i>Fst</i>
	<i>r</i>	<i>r_m</i>
River distance (km)	-0.65***	0.32***
Culverts	-0.44*	0.63***
Waterfalls	-0.37	0.55***
Barriers	-0.45*	0.66***
Elevation	-0.82***	0.01
Channel width	0.59 **	-0.26

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

The multiple linear regression on the number of culverts and waterfalls, site elevation, channel width and watershed position explained 70% of the variance of the A_R among sampling sites (adjusted $R^2 = 0.70$; $F_{2,22} = 29.44$; $P < 0.0001$; VIF Max = 1.09) (Table 5). Based on the BIC criterion, mean allelic richness per site was best explained by the number of culverts located downstream of the site ($\beta = -0.2298$; $P = 0.0765$) and by the site elevation ($\beta = -0.0096$; $P < 0.0001$). At $\alpha = 0.05$, site elevation was the only significant predictor in the model but the number of culverts was marginally non-significant (Table 5). When testing for detailed physical characteristics of culverts as additional predictors, the best model explained 75% of the variance in the observed genetic diversity (adjusted $R^2 = 0.75$; $F_{4,20} = 25.16$; $P < 0.0001$; VIF Max = 1.19) and integrated the number of waterfalls ($\beta = -0.2621$, $P = 0.0766$), the cumulative culverts outlet drop height ($\beta = -0.0117$, $P = 0.0233$) and site elevation ($\beta = -0.0087$, $P < 0.0001$) as predictors. Some riverscape variables (river distance, channel width) were no longer significant in the multiple regressions although they were statistically significant when tested with simple linear regressions. Among all predictors, site elevation was the most consistent riverscape as it was significant in all tests performed on A_R .

The Mantel test revealed an IBD effect in the Saint-Louis watershed ($r = 0.33$; $P < 0.0001$). This relationship was particularly pronounced among sites separated by barriers ($r = 0.33$; $P < 0.0001$) but inexistent among sites located on continuous reaches ($r = -0.12$; $P = 0.0106$) (Figure 5, Table 4). Consequently, Mantel tests performed between pairwise F_{st} values and the total number of barriers revealed a strong positive correlation between the two variables ($r = 0.66$ < 0.0001). The correlation when solely considering the number of culvert barriers ($r = 0.63$; $P < 0.0001$) was slightly higher than that achieved for of natural waterfalls ($r = 0.55$; $P < 0.0001$) between sites. Other variables (channel width, elevation differences) had no significant effect ($r = -0.26$; $P = 0.9964$; $r = 0.01$; $P = 0.4811$).



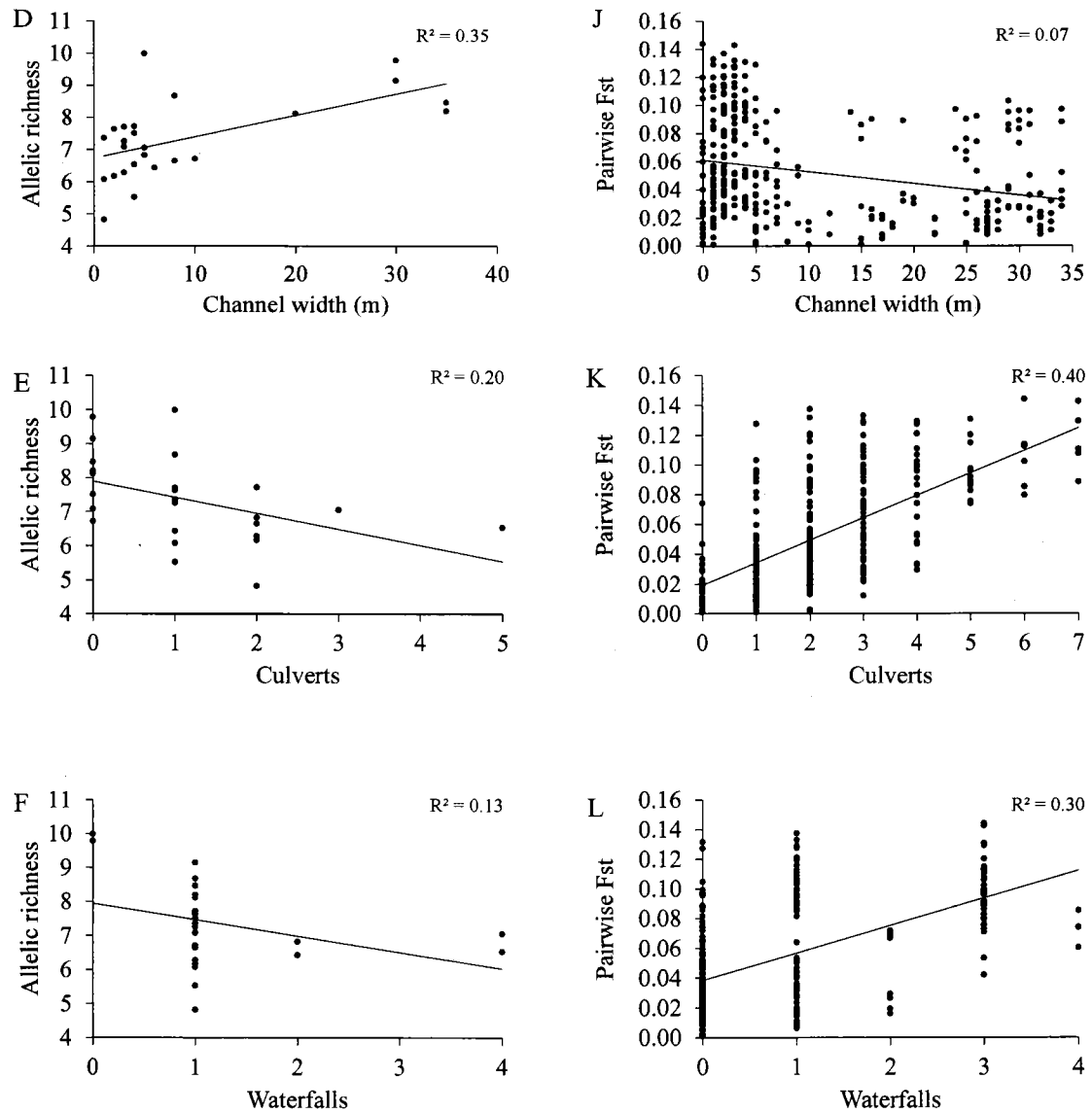


Figure 5 Relationship between geographic features and mean allelic richness (left) and pairwise *Fst* estimates (right) based on 14 microsatellite loci among the twenty five sampling locations. (G) Pairs of sampling sites located on continuous reaches (grey squares) and separated by barriers (black dots) are presented

In the MRDM analysis, 49% (adjusted $R^2 = 0.49$; $F_{4,295} = 72.31$; $P < 0.0001$; VIF Max = 1.86) of the genetic differentiation between sample locations was explained by the best model. The final model integrated the pairwise geographic distances ($\beta = 0.0001$; $P = 0.0010$), the number of culverts between sites ($\beta = 0.0091$; $P = 0.0150$), the pairwise differences in site elevation ($\beta = -0.0001$; $P = 0.1300$) and the number of waterfalls between sites ($\beta = 0.009$; $P = 0.0900$) (Table 5) as predictors of pairwise *Fst* values.

Thus, pairwise geographic distances and the number of culverts between sites were the two significant predictors in the model at a level of $\alpha = 0.05$; the effect of waterfalls was marginally non-significant. Based the adjusted R^2 , the extended model on pairwise F_{st} values was not more predictive than the general model on the level of genetic differentiation between sampling sites.

Table 5 (A) Multiple regression analysis on allelic richness (adjusted $R^2 = 0.70$; $F_{2,22} = 29.44$; $P < 0.001$); (B) Multiple regression on distance matrix on pairwise F_{st} (adjusted $R^2 = 0.49$; $F_{4,295} = 72.31$; $P < 0.001$)

Geographical feature	(A) AR		(B) Pairwise F_{st}	
	β	P -value	β	P -value
Intercept	12.0121	< 0.0001	0.0174	0.0998
Elevation	-0.0096	< 0.0001	-0.0001	0.1300
Culverts	-0.2298	0.0765	0.0090	0.0150
River distance	-	-	0.0010	0.0010
Waterfalls	-	-	0.0091	0.0900

4. DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the effect of forest-road culverts and natural waterfalls on the fine scale distribution of genetic diversity in brook charr within a boreal watershed. We tested whether the presence of both type of barriers resulted in a decrease in genetic diversity and an increase of divergence in isolated sampling sites. Results demonstrate that the distribution of genetic diversity was shaped in part by forest-road culverts and natural waterfalls. Genetic divergence was enhanced between sites separated by barriers and genetic diversity tended to be reduced within sites above barriers. Moreover, the effect of barriers appeared to be cumulative since the observed changes in divergence and diversity correlated with the number of barriers.

4.1. Fine scale distribution of genetic diversity

Brook charr in the Saint-Louis River watershed were characterized by notable fine-scale genetic variability. Position in the watershed was a good predictor of the level of observed genetic diversity with a decrease in allelic richness and expected heterozygosity towards upstream locations. These results are consistent with previous studies on salmonids and other fishes (Hänfling and Weetman 2006, Primmer *et al.* 2006, Morrissey and de Kerckhove 2009, Raeymaekers *et al.* 2009, Blanchet *et al.* 2010) reporting a decrease in genetic diversity from downstream toward upstream locations in linear or dendritic networks. However, we found that the level of A_R within sampling sites was predominantly influenced by site elevation rather than by river distance, which was thus excluded from our final models on allelic richness. Elevation was a consistent predictor in our models: sites located at higher elevation tended to be less diverse. Similar observations were reported in earlier empirical studies on brook charr and other fish species, suggesting limited gene flow and increased genetic drift toward locations of higher elevation (Hernandez-Martich and Smith 1990, Shaw *et al.* 1991, Castaic *et al.* 2001). As underlined by Castaic *et al.* (2001), populations located at higher elevations are more geographically isolated and thus may be more subject to unidirectional downstream gene flow because of the increased probability of steep river sections and physical barriers (e.g. woody debris, small waterfalls) that can prevent upstream migration. These results thus highlight the importance of considering site elevation in future riverscape genetic studies.

Our results clearly revealed the existence of a significant within-watershed genetic structure with four distinct genetic clusters whose distribution showed a clear geographical pattern. The AMOVA corroborated these clustering results with significant genetic differentiation among these four groups of locations. This observation is consistent with earlier studies on resident brook charr and other fish species (Carlsson *et al.* 1999, Hebert *et al.* 2000, Castric *et al.* 2001, Adams and Hutchings 2003, Meldgaard *et al.* 2003, Wilson *et al.* 2004, Hudy *et al.* 2010, Junker *et al.* 2012) reporting the existence of a genetic structure at a fine geographic scale within small watersheds. Significant genetic differences were also found between almost all sampling locations, regardless of the presence or absence of barriers, thus revealing further, albeit less pronounced genetic structure within each of the four clusters as highlighted by the AMOVA. Considering that only few migrants are required to maintain homogenous allele frequencies among locations (Hartl and Clark 1997), these observations indicate limited effective migration within this watershed, and particularly so among the four main clusters found. Limited dispersal was also evident from the weak IBD pattern observed, and from the identification of very few putative hybrids and migrants detected among genetic clusters by our Bayesian clustering analysis. Altogether, these findings support the restricted movement paradigm proposed by Gerking (Gerking 1959) and earlier empirical studies on brook charr (Hebert *et al.* 2000, Hudy *et al.* 2010, Kanno *et al.* 2011) reporting limited dispersal of individuals between relatively close areas.

4.2. Impact of culverts on the distribution of genetic diversity

Results revealed a significant isolation-by-culverts effect in the study drainage. As mentioned above, significant genetic differentiation was found between almost all sampling locations, regardless of the presence or absence of barriers. However, we found that sampling sites separated by culverts were characterized by higher levels of genetic differentiation than locations separated by open dispersal pathways. These results clearly indicate that gene flow among locations was lower when separated by culverts. These findings complement previous empirical studies using mark-recapture techniques reporting that movements of brook charr and other fish species were an order of magnitude lower through culverts than through natural reaches (Thompson and Rahel 1998, Warren Jr and Pardew 1998, Benton *et al.* 2008). Our observations complement these earlier findings in that even if upstream migration is hampered by the presence of culverts, downstream movements remain physically possible and could have been sufficient to limit genetic differentiation with above culvert locations.

These findings also corroborate observations from previous genetic studies on fish-habitat fragmentation by artificial barriers such as weirs or mills (Wofford et al. 2005, Raeymaekers et al. 2008, Junker et al. 2012). Moreover, the multivariate analysis revealed that the level of divergence in allele frequencies increased with the number of culverts found between sampling sites. This could have been attributed to the fact that the number of culverts between locations is often correlated with streamwise distance. However, we observed a weak correlation between these two variables. Such observations have been previously reported in empirical studies of other fish species and other types of artificial barriers including dams, weirs and mills (Meldgaard et al. 2003, Leclerc et al. 2008, Raeymaekers et al. 2008, Horreo et al. 2011) but to our knowledge, our study is the first to demonstrate this genetic pattern for culverts.

We were surprised to note that sample T13 appeared to belong to the blue cluster while the sample downstream of this was classified into the green group. One explanatory hypothesis could be that the T12 and T13 locations previously belonged to the same cluster (blue). Fish then migrated from the headwater areas (green cluster) towards T12, but have not yet reached T13, potentially due to the presence of culvert C13. Furthermore, the red cluster encompassing sampling sites T16 and T17 collected on both sides of culvert C18 suggest that this obstructed culvert has had a significant impact on genetic connectivity with the rest of the watershed. It is likely that this culvert impedes migration from downstream areas, leading to the genetic isolation of individuals located upstream (site T17). However, the fact that site T16 was also classified into the red cluster suggests that upstream migration from the main stem is limited. Gene flow instead likely originates from individuals located upstream of the culvert, presumably occurring at high discharge events. This supports the findings of Whiteley et al. (2013) who demonstrated that genetic variation can also be lost in locations downstream of barriers.

We also found a negative correlation between the level of genetic diversity and the number of culverts separating sampling sites from the outlet of the watershed, independent of their streamwise separation distance. Reduction in genetic diversity due to genetic drift can occur rapidly when migration is reduced and population size is small (Lacy 1987, Young et al. 1996, Dixo et al. 2009). Our findings thus indicate that spatial fragmentation due to successive culverts limited upstream migration and led to the isolation of reduced-size populations subject to increased genetic drift. Our results also suggested that in addition to the cumulative effect of culverts revealed by the general model on allelic richness, culvert physical characteristics also affect the degree of genetic connectivity. Indeed, we found that the cumulative culvert outlet drop height was a better predictor of the level of A_R among sampling sites than the number of

culverts. This implies that hanging culverts had a stronger impact on genetic diversity within sampling locations than culverts without outlet drops. Few culverts in the study drainage present an outlet drop height exceeding the jumping capabilities of brook charr (Kondratieff and Myrick 2006). We therefore suggest that the occurrence of outlet drops, even if small, enhanced the negative effects of culverts on upstream dispersal, resulting in a stronger asymmetric gene flow toward below hanging culverts locations. These results support previous observations (Meldgaard et al. 2003, Kyle McKay et al. 2013) highlighting that cumulative barriers along a watercourse can have substantial cumulative effects on population connectivity, even when individual barriers have a negligible impact. Even if our analysis did not reveal that other culvert physical characteristics played a role, it would be of interest in further research to assess the impact of culvert slope or roughness, given that these physical characteristics are known to alter flow dynamics and thus fish movement and gene flow (Coffman 2005).

Overall, our observations suggest that culverts can act as barriers to gene flow with a cumulative effect enhanced by the presence of outlet drops, similar to dams (Yamamoto et al. 2004) or impassable waterfalls (Carlsson and Nilsson 2001, Gomez-Uchida et al. 2009). Such impact may furthermore increase the process of genetic drift through reduction of population size and inbreeding, hence enhancing the risk of local extinction of isolated populations (Carlsson and Nilsson 2001, Letcher et al. 2007)

4.3. Limitations related to the geographic distribution of culverts

Although we found significant effects of culverts on the distribution of genetic diversity, we acknowledge that the strength of our analyses was slightly limited by the distribution of the culverts in the study watershed. Some studies (Neville et al. 2006, Kanno et al. 2011, Rodriguez 2002) have demonstrated that salmonids can display variable movement life history strategies with some individuals adopting a “resident” strategy and some “migratory” individuals. These contrasting dispersal patterns still remain poorly understood but it was however suggested that they may be influenced by riverscape structure and complexity (Neville et al. 2006). Small headwater habitats may therefore promote residency behavior while large main stems may favor migratory life histories. It logically follows that these movement strategies may influence gene flow and the distribution of genetic diversity in stream-living salmonids. It was thus documented that natural genetic differentiation could sometimes occur between populations from main stems and tributaries even in absence of barriers. In order to detect such potential natural genetic

variability, we attempted to sample systematically throughout the watershed and also reaches without any culvert. As illustrated in Figure 1, all tributaries in the watershed were however separated from the main stem by at least one culvert installed very near to the tributary mouth. As a consequence, most of our control sites were located on the main stem. Nevertheless, three control sites were located downstream of culverts on tributaries. As revealed by our analysis, the level of genetic differentiation between sampling sites and the level of genetic diversity within sites were influenced in part by the number of culverts. Without any information on life history strategies in the study watershed, it is difficult from the confounded sampling design here to disentangle the potential natural genetic variability from the impact of the presence of culverts. We can therefore only postulate that the presence of culverts exacerbate the natural spatial genetic patterns. Future studies should try to take this caveat into account by either i) comparing with the genetic structure found in another watershed not impacted by culverts or by ii) finding tributaries on which no culverts were settled.

4.4. Impact of waterfalls on the distribution of genetic diversity

We found evidence that major waterfalls impacted the distribution of genetic diversity. In accordance with our expectations and with previous studies (Carlsson and Nilsson 2001; Gomez-Uchida et al. 2009; Hindar et al. 1991; Skaala and Nævdal 1989), sampling sites isolated above major waterfalls were differentiated from all other sampling sites in the drainage. The influence of waterfalls on the genetic structure of brook charr was also particularly evident from our Bayesian clustering analysis, with one genetic cluster corresponding to the four sampling sites isolated above a group of impassable waterfalls. This observation is not surprising considering that the height of these waterfalls greatly exceeded the jumping abilities of brook charr (Hindar et al. 1991), most likely preventing all upstream movements of individuals and thus acting as barriers to upstream gene flow from the rest of the watershed. As for culverts, results of the multivariate analysis revealed that the level of divergence in allele frequencies was positively correlated with the number of intervening waterfalls between locations. This result once again demonstrates the cumulative effect of barriers on the distribution of genetic diversity within a dendritic network.

However, the effect of the number of waterfalls on genetic diversity was not evident from our models on A_R . Here, it is plausible that the mitigated evidence of the impact of waterfalls may reflect a statistical bias attributable to the configuration of the study watershed. With three of the four impassable waterfalls located on a single tributary, and the remaining one located on the

very lower part of the drainage, most sampling sites were isolated by only one waterfall from the outlet of the watershed. As a consequence, the resulting lack of heterogeneity in our dataset may reduce the ability of our models on A_R to detect significant effects of the number of waterfalls on genetic diversity within sampling sites. There was nevertheless some evidence of loss of genetic diversity induced by the presence of waterfalls. We found that 71% of private alleles detected among sampling sites were observed in one of the two sites below the impassable waterfall located on the Saint-Louis River. This observation clearly demonstrates that this geomorphic structure impedes gene flow towards upstream locations, as reported previously (Gomez-Uchida et al. 2009; Pritchard et al. 2007; Wofford et al. 2005).

4.5. Management implications

To our knowledge this study is the first to provide a watershed-wide picture of the genetic impacts of forest-road culverts in a stream network, taking into consideration other environmental factors potentially affecting patterns of genetic diversity. With strong evidence of breaks in genetic connectivity induced by the presence of culverts, our data complement earlier empirical studies on habitat fragmentation reporting significant negative genetic effects of anthropogenic barriers on fish populations including weirs (Meldgaard et al. 2003, Blanchet et al. 2010), dams (Neraas and Spruell 2001, Yamamoto et al. 2004, AlÒ and Turner 2005) and mills (Raeymaekers et al. 2009). Our study provides not only information for the prioritization of restoration programs in this watershed but also highlights useful guidelines for general management strategies of stream networks fragmented by culverts.

First, based on the low levels of A_R and H_E detected in sampling sites T14 and T17, there is clear evidence that improper installation and/or lack of maintenance of culverts C14 and C18 have led to the isolation of their upstream populations. With no potential immigration from the main stream, these populations are subject to increased effects of inbreeding and genetic drift and may thus be exposed to increased risk of extinction (Fagan 2002). We suggest that priority in the survey watershed should be given to the restoration of linkages among these two tributaries and the Saint-Louis River. We also found that culvert outlet drops, even if small, may have increased the loss of genetic diversity within isolated upstream populations. Reduced genetic diversity may reduce the adaptive potential of populations and increase the risk of extirpation because of demographic and environmental stochastic events (Yamamoto et al. 2004). Considering that similar results may be observable in comparable systems and following the recommendations made in earlier studies (Raeymaekers et al. 2009, Blanchet et al. 2010)

we recommend that restoration priority should be given to the tallest barriers and thus to hanging culverts in river systems fragmented by culverts.

However, it must also be taken into account that natural barriers such as waterfalls also shape the distribution of genetic diversity within drainages (Carlsson *et al.* 1999, Blanchet *et al.* 2010). It is therefore important that managers consider the natural breaks in genetic connectivity induced by the presence of such geomorphic features through a watershed-scale approach when planning their prioritization restoration.

The position of culverts within the system should also be taken into consideration when prioritizing restoration programs. In a recent study, Kanno *et al.* (Kanno *et al.* 2013) found that half of the surviving offspring of adult brook charr of a given stream were spawned in its tributaries. These results support previous studies on brook charr (Petty *et al.* 2005, Petty *et al.* 2012) highlighting the importance of small tributaries for the persistence of brook charr populations and thus the necessity of maintaining genetic connectivity among main stems and tributaries for the proper conservation of brook charr and other salmonids with comparable life cycles. As illustrated in our study system, forest roads are generally built along main stems, leading to the installation of culverts, especially near tributary mouths. When acting as barriers to fish movement these obstacles can lead to the physical and genetic isolation of entire tributaries, depriving salmonids from the demographic and genetic benefits of population connectivity. Letcher *et al.* (2007) demonstrated that against predictions, brook trout can sometimes persist as small isolated populations. However, as underlined by Letcher, whether rescue will occur in small fragmented populations depends on the race between local adaptation and reduced survival and there is therefore no justification for not applying the precautionary principle in management strategies. From a conservation perspective, high restoration priority should thus be given to barriers to gene flow located near tributary junctions in order to preserve linkages among mainstems and tributaries and to avoid the loss of genetic diversity in small isolated patches which may already support limited genetic diversity due to enhanced genetic drift (Whiteley *et al.* 2013). As underscored by Roni *et al.* (Roni *et al.* 2002), quality and quantity of upstream habitat isolated by problematic culverts should be evaluated when prioritizing restoration actions. Our recommendations support those made in previous studies (Roni *et al.* 2002, Poplar-Jeffers *et al.* 2009) with the necessity to adopt watershed-scale management strategies for proper conservation of fish populations and to make a prioritized list accounting for costs and benefits of restoration actions.

Acknowledgments

We are grateful to the editor, the associate editor and two anonymous referees for their helpful comments on the manuscript. We thank G. Gerzabek, F. Pichon, J. Bédard, M. Rousseau and D. Lapointe who helped us to conduct field work and collect samples. We also thank the members of labo Bergeron and labo Bernatchez for all of their help with lab and data analysis, especially S. Dugdale, G. Côté, L. Benestan, A.M. Dion Côté and V. Bourret. This study was supported by grants from the Programme de recherche en partenariat sur la forêt boréale au Saguenay-Lac-Saint-Jean-II from Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQNT).

REFERENCES

- Adams BK, Hutchings JA (2003) Microgeographic population structure of brook charr: a comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of Fish Biology* 62, 517-533.
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25, 4692-4693.
- AIÒ D, Turner TF (2005) Effects of Habitat Fragmentation on Effective Population Size in the Endangered Rio Grande Silvery Minnow. *Conservation Biology* 19, 1138-1148.
- Andrén H (1994) Effects of Habitat Fragmentation on Birds and Mammals in Landscapes with Different Proportions of Suitable Habitat: A Review. *Oikos* 71, 355-366.
- Baur B, Erhardt A (1995) Habitat fragmentation and habitat alterations: principal threats to most animal and plant species.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2000) GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000.
- Benton PD, Ensign WE, Freeman BJ (2008) The Effect of Road Crossings on Fish Movements in Small Etowah Basin Streams. *Southeastern Naturalist* 7, 301-310.
- Blanchet S, Rey O, Etienne R, Lek S, Loot G (2010) Species-specific responses to landscape fragmentation: implications for management strategies. *Evolutionary Applications* 3, 291-304.
- Carlsson J, Nilsson J (2001) Effects of Geomorphological Structures on Genetic Differentiation among Brown Trout Populations in a Northern Boreal River Drainage. *Transactions of the American Fisheries Society* 130, 36-45.
- Carlsson J, Olsén KH, Nilsson J, Øverli O, Stabell OB (1999) Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. *Journal of Fish Biology* 55, 1290-1303.
- Castric V, Bonney F, Bernatchez L (2001) Landscape structure and hierarchical genetic diversity in the brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Evolution* 55, 1016-1028.
- Chestnut T (2002) A review of closed bottom stream crossing structures (culverts) on fish-bearing streams in the Kamloops Forest District.

- Coffin AW (2007) From roadkill to road ecology: A review of the ecological effects of roads. *Journal of Transport Geography* 15, 396-406.
- Coffman JS (2005) Evaluation of a predictive model for upstream fish passage through culverts. Master's thesis, James Madison University.
- Collinge SK (1995) Spatial arrangement of patches and corridors in the landscape: consequences for biological diversity and implications for landscape architecture., Harvard University.
- Collinge SK (1996) Ecological consequences of habitat fragmentation: implications for landscape architecture and planning. *Landscape and Urban Planning* 36, 59-77.
- Corander J, Waldmann P, Sillanpää MJ (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163, 367-374.
- Coudrain V, Herzog F, Entling MH (2013) Effects of Habitat Fragmentation on Abundance, Larval Food and Parasitism of a Spider-Hunting Wasp. *PLoS ONE* 8, 1-7.
- Couvet D (2002) Deleterious Effects of Restricted Gene Flow in Fragmented Populations. *Conservation Biology* 16, 369-376.
- Debinski D, Holt R (2000) A Survey and Overview of Habitat Fragmentation Experiments. *Conservation Biology* 14, 342-355.
- Dixo M, Metzger JP, Morgante JS, Zamudio KR (2009) Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation* 142, 1560-1569.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24, 217-242.
- Epps CW, Palsbøll PJ, Wehausen JD, et al. (2005) Highways block gene flow and cause a rapid decline in genetic diversity of desert bighorn sheep. *Ecology Letters* 8, 1029-1038.
- ESRI (2011) ArcGIS Desktop: Release 10. Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.

- Fagan WF (2002) Connectivity, fragmentation, and extinction risk in dendritic metapopulations. *Ecology* 83, 3243-3249.
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34, 487-515.
- Forman RTT, Alexander LE (1998) Roads and their major ecological effects. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, 207-231.
- Fox J, Weisberg S (2011) *An R Companion to Applied Regression*. Sage, Thousand Oaks, CA.
- Frankham R (1998) Inbreeding and Extinction: Island Populations. *Conservation Biology* 12, 665-675.
- Gerking SD (1959) The restricted movement of fish populations. *Biological Reviews* 34, 221-242.
- Gibson RJ, Haedrich RL, Wernerheim CM (2005) Loss of Fish Habitat as a Consequence of Inappropriately Constructed Stream Crossings. *Fisheries* 30, 10-17.
- Gomez-Uchida D, Knight TW, Ruzzante DE (2009) Interaction of landscape and life history attributes on genetic diversity, neutral divergence and gene flow in a pristine community of salmonids. *Molecular Ecology* 18, 4854-4869.
- Gonzalez A, Blackburn TM, Evans-Freke I (1998) Metapopulation dynamics, abundance, and distribution in a microecosystem. *Science* 281, 2045-2047.
- Goslee S, Urban D (2007) The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software* 22, 1-19.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* 86, 485-486.
- Groom M, Meffe GK, Carroll CR (2005) *Principles of Conservation Biology*, 3 edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson J (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170, 1261-1280.
- Hänfling B, Weetman D (2006) Concordant Genetic Estimators of Migration Reveal Anthropogenically Enhanced Source-Sink Population Structure in the River Sculpin, *Cottus gobio*. *Genetics* 173, 1487-1501.

- Hansen MM, Nielsen EE, Mensberg KLD (1997) The problem of sampling families rather than populations: relatedness among individuals in samples of juvenile brown trout *Salmo trutta* L. *Molecular Ecology* 6, 469-474.
- Hanski I (1999) *Metapopulation ecology* Oxford University Press:i-ix.
- Harper D, Quigley J, 1966-1999. (2002) No net loss of fish habitat: an audit of forest road crossings of fish-bearing streams in British Columbia.
- Harrisson K, Pavlova A, Amos JN, et al. (2012) Fine-scale effects of habitat loss and fragmentation despite large-scale gene flow for some regionally declining woodland bird species. *Landscape Ecology* 27, 813-827.
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of population genetics*, 3 edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hebert C, Danzmann RG, Jones MW, Bernatchez L (2000) Hydrography and population genetic structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Mitchill) from eastern Canada. *Mol Ecol* 9, 971-982.
- Herbener K, Tavener S, Hobbs N (2012) The distinct effects of habitat fragmentation on population size. *Theoretical Ecology* 5, 73-82.
- Hernandez-Martich JD, Smith MH (1990) Patterns of genetic variation in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki* Girard) from the piedmont and coastal plain of three drainages. *Copeia* 1990, 619-630.
- Hindar K, Jonsson B, Ryman N, Staahl G (1991) Genetic relationships among landlocked, resident, and anadromous brown trout, *Salmo trutta* L. *Heredity* 66, 83-91.
- Hinsley SA, Pakeman R, Bellamy PE, Newton I (1996) Influences of Habitat Fragmentation on Bird Species Distributions and Regional Population Sizes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 263, 307-313.
- Holderegger R, Wagner H (2008) Landscape Genetics. *BioScience* 58, 199.
- Horreo JL, Martinez JL, Ayllon F, et al. (2011) Impact of habitat fragmentation on the genetics of populations in dendritic landscapes. *Freshwater Biology* 56, 2567-2579.
- Hudy M, Coombs JA, Nislow KH, Letcher BH (2010) Dispersal and Within-Stream Spatial Population Structure of Brook Trout Revealed by Pedigree Reconstruction Analysis. *Transactions of the American Fisheries Society* 139, 1276-1287.

- Junker J, Peter A, Wagner C, et al. (2012) River fragmentation increases localized population genetic structure and enhances asymmetry of dispersal in bullhead (*Cottus gobio*). *Conservation Genetics* 13, 545-556.
- Kanno Y, Letcher BH, Coombs JA, Nislow KH, Whiteley AR (2013) Linking movement and reproductive history of brook trout to assess habitat connectivity in a heterogeneous stream network. *Freshwater Biology* 59, 142-154.
- Kanno Y, Vokoun JC, Letcher BH (2011) Fine-scale population structure and riverscape genetics of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) distributed continuously along headwater channel networks. *Molecular Ecology* 20, 3711-3729.
- Keller I, Nentwig W, Largiader CR (2004) Recent habitat fragmentation due to roads can lead to significant genetic differentiation in an abundant flightless ground beetle. *Mol Ecol* 13, 2983-2994.
- Keyghobadi N (2007) The genetic implications of habitat fragmentation for animals This review is one of a series dealing with some aspects of the impact of habitat fragmentation on animals and plants. This series is one of several virtual symposia focussing on ecological topics that will be published in the *Journal* from time to time. *Canadian Journal of Zoology* 85, 1049-1064.
- Kondratieff MC, Myrick CA (2006) How High Can Brook Trout Jump? A Laboratory Evaluation of Brook Trout Jumping Performance. *Transactions of the American Fisheries Society* 135, 361-370.
- Kyle McKay S, Schramski JR, Conyngham JN, Craig Fischenich J (2013) Assessing upstream fish passage connectivity with network analysis. *Ecological Applications* 23, 1396-1409.
- Lacy RC (1987) Loss of Genetic Diversity from Managed Populations: Interacting Effects of Drift, Mutation, Immigration, Selection, and Population Subdivision. *Conservation Biology* 1, 143-158.
- Langlill D, Zamora P (2002) An audit of small culvert installations in Nova Scotia: habitat loss and habitat fragmentation.
- Leclerc E, Mailhot Y, Mingelbier M, Bernatchez L (2008) The landscape genetics of yellow perch (*Perca flavescens*) in a large fluvial ecosystem. *Mol Ecol* 17, 1702-1717.

- Lesbarrères D, Primmer CR, Lodé T, Merilä J (2006) The effects of 20 years of highway presence on the genetic structure of *Rana dalmatina* populations. *Ecoscience* 13, 531-538.
- Letcher BH, Nislow KH, Coombs JA, O'Donnell MJ, Dubreuil TL (2007) Population Response to Habitat Fragmentation in a Stream-Dwelling Brook Trout Population. *PLoS ONE* 2, e1139.
- Levins R (1969) Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bull. Entomol. Soc. Am* 15, 237-240.
- Lichstein J (2007) Multiple regression on distance matrices: a multivariate spatial analysis tool. *Plant Ecology* 188, 117-131.
- Lumley T, Miller A (2009) leaps: regression subset selection. R package version 2.9.
- MacCrimmon HR, Gots BL, Campbell JS (1971) World Distribution of Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*: Further Observations. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 28, 452-456.
- Mader HJ (1984) Animal habitat isolation by roads and agricultural fields. *Biological Conservation* 29, 81-96.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 189-197.
- McGarigal K, Cushman S, Neel M, Ene E (2002) FRAGSTATS: Spatial pattern analysis program for categorical maps. *Comp. software prog* (ed. Massachusetts Uo), Amherst.
- Meldgaard T, Nielsen E, Loeschcke V (2003) Fragmentation by weirs in a riverine system: A study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. *Conservation Genetics* 4, 735-747.
- Morita K, Morita S, Yamamoto S (2009) Effects of habitat fragmentation by damming on salmonid fishes: lessons from white-spotted charr in Japan. *Ecological Research* 24, 711-722.
- Morrissey MB, de Kerckhove DT (2009) The maintenance of genetic variation due to asymmetric gene flow in dendritic metapopulations. *Am Nat* 174, 875-889.

- Neraas LP, Spruell P (2001) Fragmentation of riverine systems: The genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology* 10, 1153-1164.
- Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W (1996.) *Applied Linear Statistical Models*, 4 edn. WCB/McGraw-Hill, New York.
- Neville H, Dunham J, Peacock M (2006) Landscape attributes and life history variability shape genetic structure of trout populations in a stream network. *Landscape Ecology* 21, 901-916.
- Norman JR, Hagler MM, Freeman MC, Freeman BJ (2009) Application of a Multistate Model to Estimate Culvert Effects on Movement of Small Fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* 138, 826-838.
- Ovidio M, Philippart J-C (2002) The impact of small physical obstacles on upstream movements of six species of fish. *Hydrobiologia* 483, 55-69.
- Oxley DJ, Fenton MB, Carmody GR (1974) Effects of road on populations of small mammals. *Journal of Applied Ecology* 11, 51-59.
- Park (2008) Landscape-level stream fragmentation caused by hanging culverts along roads in Alberta boreal forest. *Canadian Journal of Forest Research* 38, 566-575.
- Park D, Sullivan M, Bayne E, Scrimgeour G (2008) Landscape-level stream fragmentation caused by hanging culverts along roads in Alberta's boreal forest. *Canadian Journal of Forest Research* 38, 566-575.
- Peacock MM, Smith AT (1997) The effect of habitat fragmentation on dispersal patterns, mating behavior, and genetic variation in a pika (*Ochotona princeps*) metapopulation. *Oecologia* 112, 524-533.
- Pépino M, Rodríguez MA, Magnan P (2012) Impacts of highway crossings on density of brook charr in streams. *Journal of Applied Ecology* 49, 395-403.
- Petty JT, Hansbarger JL, Huntsman BM, Mazik PM (2012) Brook Trout Movement in Response to Temperature, Flow, and Thermal Refugia within a Complex Appalachian Riverscape. *Transactions of the American Fisheries Society* 141, 1060-1073.
- Petty JT, Lamothe PJ, Mazik PM (2005) Spatial and Seasonal Dynamics of Brook Trout Populations Inhabiting a Central Appalachian Watershed. *Transactions of the American Fisheries Society* 134, 572-587.

- Poplar-Jeffers IO, Petty JT, Anderson JT, et *al.* (2009) Culvert Replacement and Stream Habitat Restoration: Implications from Brook Trout Management in an Appalachian Watershed, U.S.A. *Restoration Ecology* 17, 404-413.
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1, 215-222.
- Prévost L, Plamondon AP, Lévesque D (2002) Méthodologie pour évaluer l'effet de l'installation des ponceaux sur l'habitat des frayères de l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*). Université Laval, Québec.
- Primmer CR, Veselov AJ, Zubchenko A, et *al.* (2006) Isolation by distance within a river system: genetic population structuring of Atlantic salmon, *Salmo salar*, in tributaries of the Varzuga River in northwest Russia. *Mol Ecol* 15, 653-666.
- Pritchard VL, Jones K, Cowley DE (2007) Genetic Diversity within Fragmented Cutthroat Trout Populations. *Transactions of the American Fisheries Society* 136, 606-623.
- R Development Core Team (2010) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raeymaekers JAM, Maes GE, Geldof S, et *al.* (2008) Modeling genetic connectivity in sticklebacks as a guideline for river restoration. *Evolutionary Applications* 1, 475-488.
- Raeymaekers JAM, Raeymaekers D, Koizumi I, Geldof S, Volckaert FAM (2009) Guidelines for restoring connectivity around water mills: a population genetic approach to the management of riverine fish. *Journal of Applied Ecology* 46, 562-571.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests.
- Roni P, Beechie TJ, Bilby RE, et *al.* (2002) A Review of Stream Restoration Techniques and a Hierarchical Strategy for Prioritizing Restoration in Pacific Northwest Watersheds. *North American Journal of Fisheries Management* 22, 1-20.
- Schaefer JF, Marsh-Matthews E, Spooner DE, Gido KB, Matthews WJ (2003) Effects of Barriers and Thermal Refugia on Local Movement of the Threatened Leopard Darter, *Percina pantherina*. *Environmental Biology of Fishes* 66, 391-400.
- Schtickzelle N, Mennechez G, Baguette M (2006) Dispersal depression with habitat fragmentation in the bog fritillary butterfly. *Ecology* 87, 1057-1065.

- Schwartz M, McKelvey K (2009) Why sampling scheme matters: the effect of sampling scheme on landscape genetic results. *Conservation Genetics* 10, 441-452.
- Schwarz G (1978) Estimating the Dimension of a Model. *The Annals of Statistics* 6, 461-464.
- Shaw PW, Carvalho GR, Magurran AE, Seghers BH (1991) Population differentiation in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*): patterns and problems. *Journal of Fish Biology* 39, 203-209.
- Skaala Ø, Nævdal G (1989) Genetic differentiation between freshwater resident and anadromous brown trout, *Salmo trutta*, within watercourses. *Journal of Fish Biology* 34, 597-605.
- Storfer A, Murphy M, Evans J (2007) Putting the "landscape" in landscape genetics. *Heredity* 98, 128-142.
- Stow AJ, Sunnucks P, Briscoe DA, Gardner MG (2001) The impact of habitat fragmentation on dispersal of Cunningham's skink (*Egernia cunninghami*): evidence from allelic and genotypic analyses of microsatellites. *Mol Ecol* 10, 867-878.
- Templeton AR, Shaw K, Routman E, Davis SK (1990) The Genetic Consequences of Habitat Fragmentation. In: *Annals of the Missouri Botanical Garden*, pp. 13-27. Missouri Botanical Garden Press.
- Thompson PD, Rahel FJ (1998) Evaluation of Artificial Barriers in Small Rocky Mountain Streams for Preventing the Upstream Movement of Brook Trout. *North American Journal of Fisheries Management* 18, 206-210.
- Trombulak SC, Frissell CA (2000) Review of Ecological Effects of Roads on Terrestrial and Aquatic Communities. *Conservation Biology* 14, 18-30.
- 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.
- Vitousek P, Mooney H, Lubchenco J, Melillo J (2008) Human Domination of Earth's Ecosystems. In: *Urban Ecology*, pp. 3-13. Springer US.
- Vos, Chardon (1998) Effects of habitat fragmentation and road density on the distribution pattern of the moor frog *Rana arvalis*. *Journal of Applied Ecology* 35, 44-56.

- Ward JV (1998) Riverine landscapes: Biodiversity patterns, disturbance regimes, and aquatic conservation. *Biological Conservation* 83, 269-278.
- Warren Jr ML, Pardew MG (1998) Road crossings as barriers to small-stream fish movement. *Transactions of the American Fisheries Society* 127, 637-644.
- Wheeler AP, Angermeier PL, Rosenberger AE (2005) Impacts of New Highways and Subsequent Landscape Urbanization on Stream Habitat and Biota. *Reviews in Fisheries Science* 13, 141-164.
- Whiteley AR, Coombs JA, Hudy M, et al. (2013) Fragmentation and patch size shape genetic structure of brook trout populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 70, 678-688.
- Wilcove DS, McLellan CH, Dobson AP (1986) Habitat fragmentation in the temperate zone.
- Wilson AJ, Hutchings JA, Ferguson MM (2004) Dispersal in a stream dwelling salmonid: Inferences from tagging and microsatellite studies. *Conservation Genetics* 5, 25-37.
- Wofford JEB, Gresswell RE, Banks MA (2005) Influence of barriers to movement on within-watershed genetic variation of coastal cutthroat trout. *Ecological Applications* 15, 628-637.
- Wright S (1943) Isolation by Distance. *Genetics* 28, 114-138.
- Yamamoto S, Morita K, Koizumi I, Maekawa K (2004) Genetic differentiation of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: Spatial-temporal changes in gene frequencies. *Conservation Genetics* 5, 529-538.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 413-418.
- Zwick P (1992) Stream habitat fragmentation — a threat to biodiversity. *Biodiversity & Conservation* 1, 80-97.

ANNEXES

Appendix I **Number of alleles (A), Allelic richness (A_R), observed (H_o) and expected heterozygotes (H_e), inbreeding coefficient (F_{IS}), significant values in bold for every locus and sampling sites**

		Sfo C113	Sfo B52	Sfo C88	Sfo C28	Sfo D100	Sfo D75	Sfo 266	Sfo C86	Sfo 23	Sfo D91	Sfo 308	Sfo 269	Sfo D105	Sfo 226	All loci
MS1	A	5.00	4.00	6.00	7.00	8.00	6.00	22.00	2.00	15.00	13.00	10.00	11.00	21.00	9.00	139.00
	AR	4.90	4.00	5.95	6.95	7.95	6.00	21.54	2.00	14.84	12.70	9.97	10.70	20.59	8.85	9.78
	Fis	0.00	-0.03	0.18	0.15	0.09	0.03	-0.09	-0.12	0.07	-0.05	-0.11	0.06	-0.03	0.02	0.01
	He	0.58	0.51	0.58	0.53	0.74	0.64	0.87	0.40	0.86	0.76	0.78	0.77	0.92	0.74	0.69
	Ho	0.58	0.53	0.48	0.45	0.68	0.63	0.95	0.45	0.80	0.80	0.87	0.73	0.95	0.73	0.69
T1	A	6.00	4.00	5.00	9.00	7.00	8.00	25.00	3.00	10.00	11.00	12.00	10.00	20.00	12.00	142.00
	AR	5.90	4.00	4.95	8.85	6.90	7.95	24.39	2.95	10.00	10.85	11.80	9.89	19.72	11.69	9.99
	Fis	0.25	-0.04	-0.06	0.22	0.10	-0.05	-0.03	-0.16	0.03	0.14	-0.08	0.03	0.02	0.07	0.03
	He	0.59	0.60	0.50	0.51	0.64	0.76	0.90	0.48	0.85	0.81	0.81	0.74	0.91	0.67	0.70
	Ho	0.45	0.63	0.53	0.40	0.58	0.80	0.93	0.55	0.83	0.70	0.88	0.73	0.90	0.63	0.68
MS2	A	4.00	6.00	5.00	7.00	6.00	5.00	21.00	2.00	13.00	8.00	9.00	8.00	16.00	6.00	116.00
	AR	4.00	5.95	5.00	6.95	5.95	5.00	20.59	2.00	12.79	7.95	9.00	7.95	15.75	5.95	8.20
	Fis	0.07	0.13	-0.15	0.07	0.00	-0.04	0.00	-0.05	0.23	0.04	0.06	0.09	0.03	-0.07	0.04
	He	0.48	0.46	0.37	0.43	0.75	0.60	0.83	0.31	0.77	0.68	0.80	0.69	0.90	0.68	0.62
	Ho	0.45	0.40	0.43	0.40	0.75	0.63	0.83	0.33	0.60	0.65	0.75	0.63	0.88	0.73	0.60
T2	A	5.00	6.00	5.00	6.00	6.00	5.00	19.00	2.00	16.00	13.00	10.00	9.00	15.00	6.00	123.00
	AR	4.90	5.95	4.90	5.95	5.95	4.95	18.80	2.00	15.75	12.74	9.85	8.90	14.90	5.95	8.68
	Fis	-0.18	0.15	-0.09	0.19	-0.06	0.02	0.07	0.11	0.08	0.02	0.13	0.19	-0.06	-0.05	0.04
	He	0.57	0.47	0.39	0.49	0.71	0.69	0.91	0.31	0.87	0.81	0.77	0.74	0.90	0.72	0.67
	Ho	0.68	0.40	0.43	0.40	0.75	0.68	0.85	0.28	0.80	0.80	0.68	0.60	0.95	0.75	0.64
T3	A	5.00	5.00	4.00	2.00	6.00	3.00	16.00	2.00	10.00	9.00	7.00	7.00	10.00	5.00	91.00
	AR	4.90	4.90	4.00	2.00	6.00	3.00	15.74	2.00	9.90	8.80	6.95	7.00	9.95	4.90	6.43
	Fis	-0.12	0.16	0.11	0.04	-0.02	0.00	0.09	0.06	0.11	0.05	-0.01	0.10	-0.10	0.09	0.04
	He	0.45	0.38	0.25	0.34	0.64	0.60	0.88	0.24	0.82	0.74	0.64	0.78	0.87	0.58	0.59
	Ho	0.50	0.33	0.23	0.33	0.65	0.60	0.80	0.23	0.73	0.70	0.65	0.70	0.95	0.53	0.56
T4	A	4.00	4.00	5.00	4.00	7.00	4.00	17.00	2.00	10.00	7.00	8.00	9.00	10.00	5.00	96.00
	AR	4.00	3.97	4.95	4.00	6.97	4.00	16.87	2.00	9.95	7.00	7.97	8.92	9.95	5.00	6.83
	Fis	-0.05	0.05	-0.13	-0.05	0.14	-0.16	-0.06	0.27	0.06	-0.16	-0.01	0.06	0.01	0.05	-0.01
	He	0.54	0.40	0.30	0.39	0.71	0.64	0.87	0.25	0.84	0.75	0.56	0.76	0.88	0.64	0.61
	Ho	0.56	0.38	0.33	0.41	0.62	0.74	0.92	0.18	0.79	0.87	0.56	0.72	0.87	0.62	0.61
T5	A	3.00	5.00	6.00	4.00	7.00	4.00	14.00	3.00	10.00	8.00	9.00	9.00	12.00	6.00	100.00
	AR	2.95	5.00	5.95	4.00	6.95	4.00	13.80	3.00	9.85	7.85	8.85	8.90	11.80	5.85	7.05
	Fis	0.33	-0.03	0.28	-0.02	-0.11	-0.06	0.04	0.16	0.11	-0.16	-0.09	0.09	-0.05	0.06	0.02
	He	0.37	0.39	0.42	0.44	0.81	0.54	0.89	0.21	0.79	0.65	0.69	0.79	0.83	0.61	0.60
	Ho	0.25	0.40	0.30	0.45	0.90	0.58	0.85	0.18	0.70	0.75	0.75	0.73	0.88	0.58	0.59
T6	A	5.00	3.00	4.00	3.00	4.00	4.00	12.00	3.00	10.00	11.00	7.00	10.00	11.00	5.00	92.00
	AR	4.95	3.00	3.97	3.00	4.00	3.97	11.92	3.00	9.92	10.85	6.97	9.95	10.95	4.97	6.53
	Fis	0.13	0.00	-0.07	-0.16	-0.01	0.18	-0.09	0.19	-0.04	-0.05	0.00	-0.05	-0.04	0.01	-0.01
	He	0.53	0.59	0.19	0.33	0.69	0.44	0.87	0.19	0.81	0.71	0.69	0.81	0.81	0.57	0.59

	Ho	0.46	0.59	0.21	0.38	0.69	0.36	0.95	0.15	0.85	0.74	0.69	0.85	0.85	0.56	0.60
MS3	A	5.00	6.00	6.00	5.00	6.00	5.00	26.00	3.00	13.00	10.00	11.00	9.00	18.00	6.00	129.00
	AR	4.97	5.97	5.97	5.00	5.97	5.00	25.77	3.00	12.90	9.92	10.92	8.90	17.82	5.95	9.15
	Fis	0.02	0.31	-0.24	0.09	0.17	0.07	-0.02	0.15	-0.10	0.02	0.09	-0.02	-0.07	0.07	0.03
	He	0.53	0.48	0.56	0.45	0.74	0.63	0.91	0.39	0.74	0.73	0.70	0.73	0.91	0.72	0.66
	Ho	0.51	0.33	0.69	0.41	0.62	0.59	0.92	0.33	0.82	0.72	0.64	0.74	0.97	0.67	0.64
T7	A	4.00	6.00	3.00	3.00	5.00	5.00	20.00	5.00	9.00	8.00	10.00	8.00	12.00	5.00	103.00
	AR	4.00	6.00	3.00	3.00	5.00	5.00	20.00	5.00	9.00	8.00	10.00	8.00	12.00	5.00	7.36
	Fis	0.03	-0.09	-0.06	-0.01	-0.02	-0.04	0.02	-0.02	0.08	0.11	0.12	0.13	0.06	-0.08	0.03
	He	0.52	0.39	0.30	0.05	0.62	0.66	0.83	0.49	0.83	0.59	0.78	0.66	0.87	0.68	0.59
	Ho	0.50	0.42	0.32	0.05	0.63	0.68	0.82	0.50	0.76	0.53	0.68	0.58	0.82	0.74	0.57
T8	A	5.00	5.00	4.00	5.00	6.00	5.00	17.00	3.00	9.00	10.00	10.00	8.00	15.00	7.00	109.00
	AR	5.00	4.90	4.00	4.95	6.00	5.00	16.69	3.00	8.95	9.80	9.95	7.90	14.75	6.95	7.70
	Fis	0.13	-0.20	0.03	-0.02	-0.10	-0.09	-0.04	0.23	0.03	0.09	0.01	-0.14	0.04	0.10	0.01
	He	0.66	0.40	0.36	0.56	0.75	0.65	0.80	0.49	0.75	0.60	0.83	0.53	0.91	0.61	0.64
	Ho	0.58	0.48	0.35	0.58	0.83	0.70	0.83	0.38	0.73	0.55	0.83	0.60	0.88	0.55	0.63
MS4	A	4.00	4.00	6.00	7.00	6.00	5.00	20.00	3.00	10.00	11.00	14.00	9.00	14.00	7.00	120.00
	AR	3.95	4.00	5.95	6.90	5.95	5.00	19.64	3.00	9.85	10.89	13.70	8.85	13.94	6.90	8.47
	Fis	-0.09	0.11	-0.09	-0.06	-0.02	-0.13	0.03	0.04	-0.13	-0.04	-0.05	0.07	0.17	0.02	-0.01
	He	0.48	0.45	0.46	0.36	0.78	0.64	0.82	0.42	0.75	0.63	0.76	0.70	0.90	0.74	0.63
	Ho	0.53	0.40	0.50	0.38	0.80	0.73	0.80	0.40	0.85	0.65	0.80	0.65	0.75	0.73	0.64
T9	A	4.00	3.00	4.00	4.00	6.00	6.00	17.00	2.00	8.00	7.00	10.00	7.00	12.00	4.00	94.00
	AR	4.00	3.00	4.00	3.95	6.00	5.85	16.70	2.00	7.95	6.95	9.89	6.85	11.90	4.00	6.65
	Fis	-0.07	0.09	0.21	-0.08	-0.14	-0.05	-0.03	-0.03	0.05	-0.03	-0.04	0.06	-0.01	-0.10	-0.02
	He	0.63	0.49	0.47	0.21	0.79	0.55	0.80	0.41	0.79	0.75	0.72	0.66	0.89	0.73	0.64
	Ho	0.68	0.45	0.38	0.23	0.90	0.58	0.83	0.43	0.75	0.78	0.75	0.63	0.90	0.80	0.65
T10	A	4.00	5.00	6.00	5.00	5.00	5.00	15.00	2.00	12.00	11.00	10.00	5.00	15.00	6.00	106.00
	AR	4.00	5.00	5.95	4.95	5.00	5.00	14.84	2.00	11.85	10.90	9.89	4.95	14.80	6.00	7.51
	Fis	-0.10	0.04	0.05	0.07	-0.02	-0.01	0.01	0.22	-0.03	0.00	-0.04	0.23	-0.01	-0.03	0.02
	He	0.43	0.39	0.63	0.54	0.71	0.55	0.88	0.41	0.83	0.75	0.58	0.49	0.91	0.75	0.63
	Ho	0.48	0.38	0.60	0.50	0.73	0.55	0.88	0.33	0.85	0.75	0.60	0.38	0.93	0.78	0.62
T11	A	4.00	5.00	6.00	6.00	6.00	5.00	19.00	2.00	11.00	11.00	8.00	6.00	14.00	6.00	109.00
	AR	4.00	5.00	5.95	5.90	6.00	5.00	18.75	2.00	10.89	10.85	7.95	5.95	13.84	5.95	7.72
	Fis	-0.06	0.09	0.12	0.08	-0.01	0.14	0.09	-0.02	0.08	0.02	0.14	-0.05	-0.04	-0.01	0.04
	He	0.43	0.52	0.45	0.52	0.72	0.55	0.93	0.37	0.76	0.71	0.67	0.57	0.89	0.74	0.63
	Ho	0.45	0.48	0.40	0.48	0.73	0.48	0.85	0.38	0.70	0.70	0.58	0.60	0.93	0.75	0.61
MS5	A	4.00	5.00	4.00	6.00	6.00	5.00	21.00	2.00	12.00	10.00	10.00	8.00	16.00	6.00	115.00
	AR	4.00	4.95	3.90	6.00	6.00	5.00	20.59	2.00	11.75	9.89	9.90	7.95	15.75	6.00	8.12
	Fis	0.07	0.29	0.42	0.09	-0.01	0.07	0.00	-0.05	0.13	-0.04	0.09	-0.01	-0.01	-0.04	0.05
	He	0.54	0.35	0.30	0.52	0.72	0.67	0.83	0.38	0.75	0.72	0.74	0.75	0.92	0.70	0.63
	Ho	0.50	0.25	0.18	0.48	0.73	0.63	0.83	0.40	0.65	0.75	0.68	0.75	0.93	0.73	0.60
T12	A	5.00	4.00	5.00	5.00	6.00	5.00	17.00	2.00	10.00	8.00	10.00	7.00	11.00	5.00	100.00
	AR	5.00	3.95	4.95	4.95	5.95	4.95	16.74	2.00	9.94	7.95	9.85	6.95	10.95	5.00	7.08
	Fis	0.09	-0.05	0.13	-0.15	-0.10	0.00	0.05	-0.13	0.07	-0.13	0.02	-0.20	0.04	-0.05	-0.02
	He	0.63	0.45	0.52	0.44	0.71	0.68	0.79	0.22	0.78	0.69	0.79	0.77	0.88	0.65	0.64
	Ho	0.58	0.48	0.45	0.50	0.78	0.68	0.75	0.25	0.73	0.78	0.78	0.93	0.85	0.68	0.66
T13	A	4.00	3.00	5.00	5.00	6.00	5.00	18.00	2.00	11.00	11.00	11.00	8.00	14.00	5.00	108.00
	AR	3.95	3.00	4.90	4.95	6.00	4.95	17.64	2.00	10.90	10.90	10.90	7.90	13.85	5.00	7.63
	Fis	-0.11	-0.09	0.01	0.02	0.06	-0.04	0.05	-0.05	0.08	-0.10	0.02	0.05	0.07	-0.04	0.00
	He	0.50	0.48	0.43	0.46	0.72	0.58	0.84	0.31	0.87	0.84	0.82	0.69	0.91	0.65	0.65
	Ho	0.55	0.53	0.43	0.45	0.68	0.60	0.80	0.33	0.80	0.93	0.80	0.65	0.85	0.68	0.65
	A	4.00	5.00	4.00	5.00	5.00	6.00	12.00	2.00	10.00	8.00	9.00	8.00	13.00	4.00	95.00

MS6	AR	3.95	4.95	3.95	4.95	5.00	5.95	11.70	2.00	9.90	7.95	8.90	7.95	12.90	3.95	6.71
	Fis	-0.18	0.01	0.18	0.03	0.01	0.10	0.01	0.17	0.19	-0.01	-0.03	-0.03	-0.02	-0.17	0.01
	He	0.55	0.40	0.30	0.39	0.63	0.55	0.61	0.39	0.77	0.72	0.82	0.81	0.90	0.62	0.61
	Ho	0.65	0.40	0.25	0.38	0.63	0.50	0.60	0.33	0.63	0.73	0.85	0.83	0.93	0.73	0.60
T14	A	2.00	3.00	3.00	5.00	5.00	5.00	11.00	2.00	11.00	4.00	7.00	6.00	10.00	4.00	78.00
	AR	2.00	3.00	2.95	4.95	5.00	4.95	10.84	2.00	10.75	4.00	6.90	6.00	10.00	4.00	5.52
	Fis	0.01	-0.06	-0.07	-0.04	-0.02	-0.09	-0.01	0.40	-0.02	-0.09	0.13	0.05	-0.12	-0.23	-0.01
	He	0.35	0.17	0.16	0.39	0.56	0.64	0.67	0.45	0.71	0.51	0.75	0.76	0.89	0.63	0.55
	Ho	0.35	0.18	0.18	0.40	0.58	0.70	0.68	0.28	0.73	0.55	0.65	0.73	1.00	0.78	0.55
T15	A	5.00	4.00	5.00	5.00	5.00	5.00	8.00	2.00	12.00	5.00	6.00	8.00	16.00	3.00	89.00
	AR	4.95	3.90	5.00	4.90	4.95	5.00	7.80	2.00	11.80	5.00	6.00	7.94	15.70	3.00	6.28
	Fis	0.02	0.09	-0.20	-0.09	-0.02	-0.05	0.06	-0.16	-0.03	0.04	-0.02	0.03	-0.04	-0.25	-0.05
	He	0.46	0.25	0.50	0.55	0.61	0.74	0.42	0.26	0.82	0.65	0.74	0.65	0.89	0.60	0.58
	Ho	0.45	0.23	0.60	0.60	0.63	0.78	0.40	0.30	0.85	0.63	0.75	0.63	0.93	0.75	0.61
T16	A	4.00	3.00	4.00	4.00	5.00	5.00	12.00	2.00	9.00	8.00	9.00	7.00	11.00	3.00	86.00
	AR	3.95	3.00	4.00	3.95	5.00	5.00	11.65	2.00	8.90	7.94	8.95	6.90	10.80	3.00	6.07
	Fis	0.08	0.20	0.30	-0.12	0.16	-0.04	-0.04	-0.24	0.04	-0.10	0.15	-0.01	0.01	-0.08	0.03
	He	0.54	0.47	0.46	0.27	0.51	0.58	0.63	0.40	0.76	0.77	0.79	0.77	0.86	0.58	0.60
	Ho	0.50	0.38	0.33	0.30	0.43	0.60	0.65	0.50	0.73	0.85	0.68	0.78	0.85	0.63	0.58
T17	A	2.00	2.00	3.00	3.00	4.00	4.00	8.00	2.00	7.00	7.00	7.00	5.00	11.00	3.00	68.00
	AR	2.00	2.00	3.00	2.95	4.00	4.00	7.95	2.00	6.95	6.95	7.00	4.95	10.80	3.00	4.82
	Fis	0.09	-0.13	-0.09	-0.02	0.01	-0.10	0.18	-0.14	0.14	-0.05	-0.05	-0.16	-0.11	-0.07	-0.03
	He	0.47	0.49	0.55	0.07	0.53	0.48	0.64	0.35	0.75	0.81	0.71	0.71	0.81	0.51	0.56
	Ho	0.43	0.55	0.60	0.08	0.53	0.53	0.53	0.40	0.65	0.85	0.75	0.83	0.90	0.55	0.58
MS7	A	5.00	3.00	5.00	6.00	6.00	5.00	13.00	3.00	12.00	8.00	9.00	6.00	16.00	6.00	103.00
	AR	4.90	3.00	4.90	5.95	5.95	5.00	12.65	3.00	11.80	7.85	8.95	5.95	15.79	5.90	7.26
	Fis	-0.04	-0.11	0.00	0.10	0.05	0.15	-0.14	0.09	-0.05	0.08	-0.10	-0.04	0.00	-0.10	-0.01
	He	0.43	0.25	0.40	0.47	0.66	0.68	0.66	0.44	0.77	0.65	0.80	0.72	0.90	0.66	0.61
	Ho	0.45	0.28	0.40	0.43	0.63	0.58	0.75	0.40	0.80	0.60	0.88	0.75	0.90	0.73	0.61
T18	A	5.00	4.00	3.00	3.00	5.00	5.00	8.00	3.00	10.00	7.00	9.00	8.00	13.00	4.00	87.00
	AR	5.00	3.95	3.00	3.00	5.00	4.95	7.85	3.00	9.99	6.90	8.95	7.90	12.90	4.00	6.17
	Fis	0.09	-0.14	-0.03	0.41	-0.01	-0.05	-0.02	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.00	-0.07	0.01
	He	0.66	0.31	0.49	0.34	0.62	0.57	0.56	0.46	0.74	0.70	0.84	0.76	0.90	0.63	0.61
	Ho	0.60	0.35	0.50	0.20	0.63	0.60	0.58	0.45	0.73	0.70	0.83	0.75	0.90	0.68	0.61
All samples	Sum A	10.00	7.00	7.00	9.00	9.00	8.00	38.00	6.00	21.00	15.00	18.00	18.00	30.00	16.00	212.00
	Mean AR	5.32	5.56	5.47	6.27	6.08	5.57	20.16	2.62	13.35	10.64	10.91	9.56	14.46	6.62	8.75
	Mean Fis	0.02	0.03	0.03	0.03	0.00	-0.01	0.00	0.04	0.05	-0.02	0.01	0.02	-0.01	-0.04	0.01
	Mean He	0.52	0.42	0.41	0.40	0.68	0.61	0.79	0.36	0.79	0.71	0.74	0.71	0.89	0.66	0.62
	Mean Ho	0.51	0.41	0.40	0.39	0.68	0.62	0.78	0.35	0.75	0.72	0.73	0.70	0.90	0.68	0.62

Appendix II Multilocus pairwise *Fst* estimates (above the main diagonal; significant values in bold) and pairwise geographical distances (Km) for the twenty five sample locations

Location	MS1	T1	MS2	T2	T3	T4	T5	T6	MS3	T7	T8	MS4	T9	T10	T11	MS5	T12	T13	MS6	T14	T15	T16	T17	MS7	T18
MS1		0.00	0.01	0.01	0.07	0.07	0.06	0.07	0.01	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.03	0.05	0.04	0.04	0.08	0.03	0.03
T1	1.0		0.03	0.02	0.07	0.07	0.07	0.09	0.02	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.05	0.06	0.05	0.05	0.09	0.04	0.05
MS2	4.2	3.8		0.01	0.10	0.09	0.07	0.09	0.00	0.03	0.01	0.00	0.02	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02	0.04	0.02	0.04	0.09	0.01	0.02
T2	6.2	5.8	2.1		0.05	0.04	0.04	0.05	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	0.05	0.04	0.04	0.07	0.02	0.03
T3	6.8	6.4	2.6	0.5		0.00	0.02	0.03	0.10	0.10	0.12	0.10	0.09	0.13	0.12	0.09	0.09	0.10	0.09	0.14	0.13	0.11	0.13	0.12	0.11
T4	7.7	7.3	3.5	1.5	0.9		0.02	0.03	0.09	0.10	0.11	0.10	0.09	0.12	0.11	0.09	0.08	0.09	0.08	0.13	0.12	0.10	0.12	0.11	0.11
T5	9.1	8.7	5.0	2.9	2.3	1.4		0.02	0.08	0.09	0.10	0.08	0.08	0.11	0.10	0.08	0.07	0.08	0.08	0.13	0.11	0.10	0.13	0.10	0.10
T6	10.0	9.6	5.8	3.7	3.2	2.3	0.8		0.09	0.10	0.11	0.10	0.09	0.12	0.11	0.09	0.08	0.08	0.09	0.14	0.13	0.11	0.14	0.11	0.11
MS3	8.4	8.0	4.2	2.6	3.1	4.0	5.5	6.3		0.03	0.02	0.00	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.03	0.04	0.03	0.04	0.09	0.01	0.02
T7	9.6	9.2	5.5	3.8	4.4	5.3	6.7	7.6	1.2		0.04	0.03	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.06	0.07	0.10	0.04	0.05
T8	15.9	15.5	11.8	10.1	10.7	11.6	13.0	13.8	7.5	7.0		0.01	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.03	0.03	0.06	0.04	0.05	0.10	0.02	0.03
MS4	15.7	15.3	11.5	9.9	10.4	11.3	12.8	13.6	7.3	6.7	0.5		0.01	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.05	0.04	0.05	0.10	0.02	0.03
T9	17.3	16.9	13.1	11.4	12.0	12.9	14.3	15.2	8.9	8.3	2.1	1.6		0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.05	0.07	0.05	0.06	0.10	0.04	0.05
T10	16.4	16.0	12.2	10.6	11.2	12.1	13.5	14.3	8.0	7.4	1.3	0.8	1.4		0.00	0.02	0.04	0.02	0.07	0.06	0.04	0.08	0.13	0.04	0.06
T11	17.0	16.6	12.8	11.2	11.7	12.6	14.0	14.9	8.6	8.0	1.8	1.3	2.0	0.5		0.02	0.03	0.03	0.08	0.05	0.05	0.08	0.13	0.04	0.06
MS5	27.1	26.7	22.9	21.3	21.8	22.7	24.2	25.0	18.7	18.1	11.9	11.4	12.1	10.9	11.4		0.01	0.01	0.02	0.03	0.02	0.04	0.09	0.00	0.02
T12	32.6	32.2	28.4	26.8	27.4	28.3	29.7	30.5	24.2	23.6	17.5	16.9	17.6	16.4	17.0	5.6		0.01	0.02	0.04	0.02	0.02	0.06	0.01	0.02
T13	33.1	32.7	28.9	27.3	27.9	28.8	30.2	31.0	24.7	24.1	18.0	17.4	18.1	16.9	17.5	6.1	0.5		0.03	0.05	0.04	0.05	0.09	0.02	0.03
MS6	33.7	33.3	29.6	27.9	28.5	29.4	30.8	31.7	25.3	24.8	18.6	18.1	18.7	17.5	18.1	6.7	1.6	2.1		0.05	0.04	0.02	0.06	0.02	0.00
T14	34.3	33.9	30.1	28.5	29.1	30.0	31.4	32.2	25.9	25.3	19.2	18.6	19.3	18.1	18.7	7.2	2.2	2.7	0.6		0.03	0.05	0.10	0.02	0.04
T15	35.6	35.2	31.4	29.8	30.3	31.2	32.7	33.5	27.2	26.6	20.4	19.9	20.6	19.4	19.9	8.5	3.5	4.0	1.9	1.8		0.05	0.10	0.01	0.03
T16	38.1	37.7	33.9	32.3	32.8	33.7	35.2	36.0	29.7	29.1	22.9	22.4	23.1	21.9	22.4	11.0	6.0	6.5	4.4	4.3	3.0		0.01	0.03	0.01
T17	38.3	37.9	34.1	32.5	33.1	34.0	35.4	36.2	29.9	29.3	23.1	22.6	23.3	22.1	22.7	11.2	6.2	6.7	4.6	4.5	3.3	0.2		0.08	0.06
MS7	38.5	38.1	34.3	32.7	33.2	34.2	35.6	36.4	30.1	29.5	23.3	22.8	23.5	22.3	22.9	11.4	6.4	6.9	4.8	4.7	3.4	0.6	0.8		0.01
T18	38.8	38.4	34.6	33.0	33.6	34.5	35.9	36.7	30.4	29.8	23.6	23.1	23.8	22.6	23.2	11.7	6.7	7.2	5.1	5.0	3.8	0.9	1.1	0.3	

