

Université de Montréal

**Caractérisation de l'habitat d'une communauté de
salamandres de ruisseaux comportant des hybrides**

par

Anaïs Boutin

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

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

Avril 2006

© Anaïs Boutin, 2006

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation de l'habitat d'une communauté de salamandres de ruisseaux
comportant des hybrides

présenté par :
Anaïs Boutin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

M. Jacques Brisson, président-rapporteur
M. François-Joseph Lapointe, directeur de recherche
M. Pierre Legendre, membre du jury

RÉSUMÉ

La communauté de salamandres de ruisseaux à l'étude comporte au moins cinq espèces, certaines au statut précaire, et des hybrides *Desmognathus*. Face à l'important manque de connaissances sur l'habitat de ces espèces au Québec, la caractérisation de l'habitat de la communauté de salamandres de Covey Hill a été réalisée de mai à septembre 2004. Les préférences écologiques des espèces ont été identifiées et suivent un gradient d'humidité en réponse aux pressions de compétition et de prédation. Au total, 18 variables expliquent l'abondance des espèces dans l'habitat. Les salamandres sombres ont montré une importante ségrégation de niche écologique et leurs hybrides partagent des habitats similaires à l'espèce maternelle. Les analyses de l'ADN mitochondrial et nucléaire, comme les enzymes de restriction, ont permis de valider deux critères d'identification morphologique des salamandres sombres et des hybrides. Il fut démontré que ces critères étaient fiables pour les espèces parentales mais pas infaillibles.

Mots-clés : ADN mitochondrial, ADN nucléaire, analyse de communauté, hybrides *Desmognathus*, identification moléculaire, identification morphologique, niches écologiques, salamandres de ruisseaux, sélection d'habitat, variables environnementales.

ABSTRACT

The stream salamander community under study includes five Plethodontid species, some with a precarious status, and *Desmognathus* hybrids. Confronted to the important lack of knowledge of these species ecological requirements in Québec, the habitat of the community of salamanders of Covey Hill was characterized between May and September 2004. The ecological preferences of the species were interpreted in response to competition and predation pressures and follow a moisture gradient. A total of 18 variables were relevant to explain the species abundances in the habitat. The dusky salamanders showed an important niche segregation and their hybrids shared similar habitats to the maternal species. Molecular analyses of mitochondrial and nuclear DNA, as well as restriction enzymes allowed the validation of two morphological characters used for the identification of dusky salamanders and hybrids. It was demonstrated that these characters are reliable for the parental species but not infallible.

Keywords : *Desmognathus* hybrids, community analysis, ecological niches, environmental variables, habitat selection, mitochondrial DNA, molecular identification, morphological identification, nuclear DNA, stream salamander.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1.1. Les Pléthodontidés	2
1.2. Les <i>Desmognathus</i> du Québec	5
1.3. Biologie des espèces	5
1.3.1. Distribution	5
1.3.2. Cycle vital	8
1.3.3. Domaine vital et déplacements	12
1.3.4. Activité.....	13
1.3.5. Hybridation et identification morphologique.....	13
1.4. Écologie des Pléthodontidés	17
1.4.1. Compétition.....	17
1.4.2. Prédation	18

1.4.3. Ségrégation spatiale des espèces dans l’habitat	18
1.4.4. Exigences écologiques	19
1.5. Problématique	21
1.6. Organisation du mémoire	25
CONTRIBUTION DES COAUTEURS	26
CHAPITRE 2: HABITAT SELECTION IN A STREAM SALAMANDER COMMUNITY INCLUDING <i>DESMOGNATHUS</i> HYBRIDS	27
ACCORD DES COAUTEURS.....	28
2.1. Résumé	29
2.2. Abstract	30
2.3. Introduction	31
2.4. Methods	33
2.4.1. Salamander survey	33
2.4.2. Statistical analyses	38
2.5. Results	40
2.5.1. Salamander survey	40
2.5.2. Statistical analysis	40
2.6. Discussion	48
2.6.1. <i>Plethodon cinereus</i>	49
2.6.2. <i>Eurycea bislineata</i>	51
2.6.3. <i>Gyrinophylus porphyriticus</i>	52
2.6.4. <i>Desmognathus fuscus</i> and <i>Desmognathus ochrophaeus</i>	53
2.6.5. <i>Desmognathus</i> hybrids	56

2.7. Acknowledgments	57
CHAPITRE 3: MORPHOLOGICAL CHARACTERS MAY BE RELIABLE TO IDENTIFY <i>DESMOGNATHUS OCHROPHAEUS</i> AND <i>D. FUSCUS</i> , BUT NOT ALWAYS WITH HYBRIDS.....	58
ACCORD DES COAUTEURS.....	59
3.1. Résumé	60
3.2. Abstract	61
3.3. Introduction	62
3.4. Materials and methods	64
3.4.1. Salamander sampling	64
3.4.2. Morphological identification.....	64
3.4.3. Molecular identification.....	67
3.5. Results	68
3.6. Discussion	71
3.7. Acknowledgments	72
CHAPITRE 4: CONCLUSION	73
4.1. Caractérisation de l’habitat de la communauté de salamandres de Covey Hill	74
4.2. Identification moléculaire des salamandres sombres et des hybrides	75
4.3. Application pour la conservation	76
BIBLIOGRAPHIE	78
APPENDIX I.....	xi

LISTE DES TABLEAUX

Table 2-I. Details of the environmental variables measured at each site.	35
Table 2-II. Percent of total inertia of species abundances explained by the environmental variables for all explanatory variables and the ones selected in the model.	41
Table 2-III. Relative contribution of the environmental variables retained for each month, among which some were excluded from analysis because of missing data (n/a) and some failed to be retained by the forward selection (-).....	42
Table 3-I. Molecular identification of <i>D. ochrophaeus</i> , <i>D. fuscus</i> , and hybrids, based on a mitochondrial DNA region (12S), a nuclear DNA region (RAG-1) and restrictions enzymes (HpaII and HhaI) to validate the morphological identification.....	70

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1.** Distribution de la salamandre sombre des montagnes (*Desmognathus ochrophaeus*) et de la salamandre sombre du nord (*Desmognathus fuscus*) en Amérique du Nord et au Canada avec les régions de (1) Covey Hill au Québec, et (2) Niagara Falls en Ontario. (Modifié de Conant & Collins 1998)..... 7
- Figure 1.2.** Identification morphologique de *a) Desmognathus ochrophaeus* et *b) Desmognathus fuscus* à partir de la forme des lignes dorso-latérales (1) et des caractéristiques de la bande dorsale (2). 16
- Figure 2.1.** Distribution of *Desmognathus fuscus* and *D. ochrophaeus* in North America, with the study area of Covey Hill (Québec) indicated. Modified from Conant & Collins (1998). 34
- Figure 2.2.** CCA ordination of the species abundances constrained by the environmental variables selected for each of the five months studied. Projection of the species (lines), of the quantitative or semi-quantitative (arrows) and binary (Δ) environmental variables. The two first canonical axes explain respectively *a) 78.9%*, *b) 69.7%*, *c) 90.3%*, *d) 83.2%* and *e) 78.4%* of the inertia in the species abundance data. Variables are all significant at the $\alpha = 0.05$ level..... 45
- Figure 2.3.** Among-month variability illustrated in the space of the first two principal coordinates, obtained from analysing a matrix of the Mantel statistics comparing presence-absence data (coefficient proposed by Sokal & Sneath 1963). The first two

principal coordinates (PCoA axes I and II) explained 30.1% and 27.3% of the total variation, respectively. 47

Figure 3.1. Morphological identification of a) *Desmognathus ochrophaeus* and b) *Desmognathus fuscus* based on the shape of the dorsolateral stripes (1) and characteristics of the dorsal band (2). 66

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
DNA	Deoxyribonucleic acid
mtDNA	Mitochondrial DNA
nucDNA	Nuclear DNA
dNTP	Deoxyribonucleic triphosphates
bp	Base pair
COSEPAC	Comité sur la situation des espèces en péril au Canada
MRNF	Ministère des Ressources naturelles et de la Faune
PCR	Polymerase chain reaction
cm	Centimètre, centimetre
m	Mètre, metre
km	Kilomètre, kilometre
sec	Second
min	Minute
mM	Millimolar
μ M	Micromolar
μ l	Microlitre
U	Unit
Nb	Number, Nombre
F1	Première génération, First generation
F2	Seconde génération, Second generation
°C	Degree Celsius

À la mémoire de Lionel Del Giovane (1983-2004)

*Mon Grand Bleu,
demeuré auprès des sirènes...*

*Parce que sa curiosité et sa passion pour
l'herpétofaune étaient sans pareils*

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier vivement mon directeur, François-Joseph Lapointe qui m'a reçue dans la merveilleuse famille qu'est le LEMEE. J'ai eu ainsi le privilège d'être épaulée avec enthousiasme, dans un milieu de travail des plus agréables et enrichissants. Non seulement il m'a aidée à atteindre les objectifs académiques, scientifiques et professionnels que je m'étais fixés au départ, mais il s'est également assuré que ce projet me corresponde. Dépassant toute espérance j'ai découvert, en plus d'un scientifique émérite, un directeur incomparable, artiste à ses heures, avec un côté humain extraordinaire et une spontanéité certainement hors du commun ! Merci pour ta disponibilité, ton esprit critique et ton support constant, à tous les niveaux... même dans les estrades du terrain de football ! Cette première expérience dans le monde de la recherche fut inoubliable, et c'est donc avec plus d'assurance que j'envisage mes futurs projets.

J'aimerais également remercier Nathalie Tessier de m'avoir initiée à un tout nouveau champ d'expérience, depuis le fonctionnement d'une pipette... jusqu'à l'analyse moléculaire ! J'ai énormément appris à tes côtés. Merci également pour toutes les petites attentions que tu sais si bien apporter à chacun de nous, mais aussi pour ta bonne humeur qui a su égayer tant de journées ! Merci aussi aux autres membres de la famille, chers amis : Olivier, Sarah, Sébastien, Véronique et Yong pour votre complicité et vos très nombreux coups de main ! Merci pour tous ces agréables dîners en votre chaleureuse compagnie, pour ces moments mémorables : concours, bricolages...

Je tiens aussi à dire un merci chaleureux à Claude Daigle, à Jacques Jutras et à Lyne Bouthillier pour leur aide à la planification de ce projet et pour m'avoir initiée à la capture

des salamandres de ruisseaux. Merci également à Alexandra, à Geneviève et à Yannick; votre aide sur le terrain a été grandement appréciée.

Je suis également très reconnaissante à mes parents, Lyne et Réjean, d'avoir toujours cru en mes capacités, même lorsque je pouvais en douter moi-même. Vos précieux conseils m'ont toujours guidée. Merci de m'avoir soutenue dans ce cheminement, de m'avoir permis de faire des stages et des voyages mémorables.

Un sincère merci à Gabriel, d'avoir eu confiance en moi tout au long de ce chemin qu'on a parcouru ensemble, de l'algèbre linéaire à aujourd'hui. Merci pour ton support, ton écoute ta complicité, et surtout ta présence.

Finalement, je remercie les organismes subventionnaires qui m'ont permis de réaliser ce projet: Environnement Canada et la Fondation de la faune du Québec.

CHAPITRE 1:
INTRODUCTION

1.1. LES PLÉTHODONTIDÉS

Les salamandres de la famille des Pléthodontidés sont caractérisées par l'absence de poumons chez les adultes (Noble 1913) qui respirent par la peau et les muqueuses des régions buccale et pharyngienne (Withford & Hutchison 1967, Gatz *et al.* 1975, Feder & Burggren 1985). De loin la plus grande famille de salamandres, avec 250 espèces connues, elle se subdivise en deux sous-familles : les Desmognathinés et les Pléthodontinés (Frost 1985, Duellman 1993). Deux genres sont reconnus parmi les Desmognathinés : *Desmognathus* et *Phaeognathus*. Ce dernier ne comprend qu'une seule espèce : *Phaeognathus hubrichti*. Le genre *Desmognathus* quant à lui comprend actuellement 19 espèces (Frost 2004) parfois étroitement liées et dont les relations phylogénétiques demeurent irrésolues.

Historiquement, le genre *Desmognathus* a été l'un des plus problématiques à résoudre chez les amphibiens en raison de la synonymie des espèces (Karlin & Guttman 1986). En effet, de nombreux problèmes taxonomiques ou phylogénétiques sont causés par la grande variation morphologique des espèces, laquelle a mené, au cours des années, à l'identification de nombreuses sous-espèces. En effet, un nombre impressionnant de synonymes existent pour certaines espèces du genre *Desmognathus* (*i.e.* 25 pour *D. fuscus*, 17 pour *D. orestes*, 9 pour *D. ochrophaeus*, Frost 2004). Les morphes reconnus varient dans la coloration, les caractéristiques des patrons dorsaux ou l'indice mélanique (Martof & Rose 1962, Tilley 1969, Anderson & Tilley 2003), des composantes influencées par différents degrés de variation génétique, ontogénique ou sexuelle (Tilley 1969). Par exemple, la densité des mélanophores chez les *Desmognathus* augmente avec l'âge; ainsi, les plus vieux spécimens, spécialement les mâles, deviennent très foncés et sont alors plus difficilement identifiables (Huheey 1966, Tilley 1969). Des variations majeures dans les patrons dorsaux furent rapportées entre les populations de *D. ochrophaeus* et *D. fuscus* du nord et celles du sud, où des phénotypes différents sont fixés (Tilley 1969, Karlin & Guttman 1986). La variabilité

morphologique entre les espèces du genre *Desmognathus* est également reliée à l'environnement. En plus des variations géographiques existantes, les patrons de coloration dorsaux ainsi que la taille des individus varient selon l'altitude et suivent un gradient latitudinal (Tilley *et al.* 1978).

L'important polymorphisme au sein des *Desmognathus* existe autant entre les populations qu'au sein des populations (Huheey 1966, Tilley 1969, 1973a) et implique probablement du mimétisme (Tilley *et al.* 1978). Les caractères morphologiques semblent hautement variables et homoplasiques, ce qui complique autant l'identification des espèces que la systématique du genre (Larson 1984, Wake 1991). Également, de nombreux morphes intermédiaires furent identifiés (Dunn 1926, King 1939, Hairston 1949, Martof & Rose 1963), ce qui rend leur attribution à une espèce difficilement réalisable ou incertaine.

Le manque de résolution dans les phylogénies des Pléthodontidés a également été observé avec les analyses basées sur des caractères morphologiques (Lombard & Wake 1986, Presh 1989, Wake 1993). Cependant, la venue de méthodes moléculaires a permis de mettre à jour une grande variabilité génétique inter et intraspécifique (Karlin & Guttman 1986) et conséquemment certaines sous-espèces furent reclassées au niveau d'espèces (Titus & Larson 1996). Au sein du genre *Desmognathus*, *D. ochrophaeus* serait l'espèce la plus variable génétiquement (Rissler & Taylor 2003). Les individus de cette espèce s'avèrent rarement monophylétiques, même lorsque les spécimens sont récoltés dans une région restreinte (Titus & Larson 1996, Rissler & Taylor 2003). Également, les populations nordiques de *D. fuscus* sont à ce point différentes de celles du sud (Tilley & Schwerdtfeger 1981, Karlin & Guttman 1981, 1986), que la distance génétique entre ces populations est plus importante que celle entre des populations de *D. fuscus* du nord et de *D. ochrophaeus* du sud. Près de 25 % de la diversité génétique

réside au sein des populations de *D. fuscus* alors qu'un autre 25 % est associé aux régions géographiques (Karlin & Guttman 1986).

Les relations phylogénétiques et taxonomiques des *Desmognathus* sont grandement compliquées par la présence d'hybridation entre certaines espèces, ainsi que par la présence d'isolement reproductif, autant entre des populations d'espèces allopatriques que sympatriques. Effectivement, au sein du groupe, de nombreuses espèces peuvent s'hybrider (Verrell 1990a, 1990b, 1990c, Verrell & Tilley 1992, Arnold *et al.* 1996). L'hybridation confère aux descendants de la première génération (F1) un bagage génétique intermédiaire entre les espèces parentales. Ainsi, pour l'ensemble des locus étudiés avec l'ADN nucléaire, tous les individus devraient posséder des allèles de chacune des deux espèces. Cependant, lors de l'analyse des allozymes, des nombres variables de locus portant les deux allèles de la même espèce ont été observés chez les hybrides (Sharbel *et al.* 1995, Rissler & Taylor 2003). Il a été suggéré que des rétrocroisements auraient lieu entre les hybrides et les espèces parentales, expliquant la plus grande ressemblance génétique des hybrides à un des deux parents (Karlin & Guttman 1981, Sharbel *et al.* 1995). Cette observation pourrait être également attribuable à de l'hybridation ancestrale (Rissler & Taylor 2003). Étant donné la proximité phylogénétique de certains membres du genre et la difficulté de départager certaines sous-espèces ou espèces interfécondes, deux complexes d'espèces ont été créés. Le premier comporte six espèces (*D. ochrophaeus*, *D. ocoee*, *D. carolinensis*, *D. orestes* et *D. imitator*, Tilley & Mahonney 1996) alors que le second comprend *D. fuscus* et *D. santeetlah* (Petranka 1998).

Même avec les analyses enzymatiques (Tilley *et al.* 1978) ou moléculaires (Titus & Larson 1996, Mead *et al.* 2001, Rissler & Taylor 2003), l'absence de résolution des phylogénies persiste et les relations évolutives entre les espèces demeurent ambiguës. Une radiation évolutive rapide des espèces au sein de ce groupe expliquerait la

diversification de ce genre le long de sa distribution nord-américaine (Titus & Larson 1996, Mead *et al.* 2001, Rissler & Taylor 2003). Il semble que le genre *Desmognathus* forme un complexe d'espèces cryptiques dont l'évolution est parfois difficile à retracer (Rissler & Taylor 2003).

1.2. LES *DESMOGNATHUS* DU QUÉBEC

Alors que le genre *Desmognathus* atteint sa plus grande diversité dans les Appalaches, seulement deux espèces sont présentes au Québec: la salamandre sombre du nord (*D. fuscus*) et la salamandre sombre des montagnes (*D. ochrophaeus*). Celles-ci atteignent la limite nord de leur distribution au Québec.

1.3. BIOLOGIE DES ESPÈCES

1.3.1. Distribution

En Amérique du Nord, *D. ochrophaeus* se retrouve dans les Adirondacks, au nord de l'état de New York, vers l'ouest en Ohio et au sud en Pennsylvanie sauf dans sa partie sud-est (Figure 1.1). L'espèce est présente dans le nord-est du Maryland, l'est et le sud de la Virginie occidentale jusqu'au Kentucky. À l'extrême ouest de la Virginie elle est retrouvée jusque dans la portion sud des Blue Ridge Mountains à l'est du Tennessee. Sa distribution englobe également l'ouest de la Caroline du Nord jusqu'au nord de la Géorgie (Orr 1989). Dans la partie nord de son aire de répartition, elle est apparemment absente du Vermont, qui constitue probablement la limite est de sa distribution (Alvo & Bonin 2003). *D. ochrophaeus* est une espèce montagnaise, retrouvée en altitude et dont l'aire de répartition est comprise à l'intérieur de celle de *D. fuscus*, qui se retrouve à des altitudes moins élevées (Houk *et al.* 1988). Cette dernière est largement distribuée dans les régions montagneuses de l'est de l'Amérique du Nord (Hairston 1987). Sa

distribution comprend les montagnes des Appalaches et une partie des basses terres environnantes (Figure 1.1).



Figure 1.1. Distribution de la salamandre sombre des montagnes (*Desmognathus ochrophaeus*) et de la salamandre sombre du nord (*Desmognathus fuscus*) en Amérique du Nord et au Canada avec les régions de (1) Covey Hill au Québec, et (2) Niagara Falls en Ontario. (Modifié de Conant & Collins 1998).

À l'échelle canadienne, *D. ochrophaeus* n'avait été retrouvé que sur le versant nord de Covey Hill, une colline située en Montérégie, dans les contreforts des Adirondacks (Sharbel & Bonin 1992). Le secteur abritant l'espèce se trouve à une centaine de kilomètres au sud de Montréal, à proximité de la frontière de l'état de New York (Figure 1.1). Tout récemment, cette espèce a également été observée à un site près de Niagara Falls en Ontario (Comm. pers. Jacques Jutras 2005). *D. fuscus* quant à lui est présent au sud du Québec, au Nouveau-Brunswick et dans une région restreinte de l'Ontario, à quelques kilomètres au nord de Niagara Falls (Conant & Collins 1998, Figure 1.1).

1.3.2. Cycle vital

1.3.2.1. Reproduction et ponte

Le cycle reproducteur des *Desmognathus* varie géographiquement. Chez *D. ochrophaeus*, la période de reproduction a été rapportée au printemps, à l'été et à l'automne (Petranka 1998). La majorité des femelles des populations de l'Ohio se reproduisent annuellement (Fitzpatrick 1973, Keen & Orr 1980). Selon d'autres auteurs, l'espèce se reproduirait une fois par année (Martof & Rose 1963), une fois aux deux ans (Organ 1961) ou de deux à quatre fois tous les deux ans (Tilley & Tinkle, 1968). Tilley (1973c) estime toutefois que les pontes bi-annuelles sont peu probables chez une même femelle et explique l'observation de deux périodes de ponte par des reproductions synchrones entre un groupe de femelles se reproduisant l'été et un autre se reproduisant l'hiver. Dans cette situation, les premières femelles pondraient à l'automne, alors que les secondes pondraient au printemps (Tilley 1973c). À peu d'exceptions près, la ponte chez *D. ochrophaeus* débute en mars, atteint son maximum à la mi-mai et se poursuit en septembre (Orr 1989). Dans l'état de New York, la ponte est au printemps et à l'automne (Bishop 1941), alors que dans les Appalaches, elle a lieu majoritairement durant l'été (Tilley 1973c). En Ohio, l'oviposition a lieu après l'émergence à la mi-avril, atteint son maximum à la mi-mai et se poursuit jusqu'en septembre (Fitzpatrick 1973). Dans ces

mêmes régions, des pontes furent rapportées en hiver et au printemps alors qu'elles avaient eu lieu dans des dépressions du sol (Keen & Orr 1980).

D. fuscus se reproduit au printemps et à l'automne dans les états de New York et de la Virginie. Toutefois, dans plusieurs de ces populations, les femelles ne pondent qu'une fois par année (Bishop 1941, Organ 1961). Les périodes de ponte sont comparables entre les populations le long de la distribution de l'espèce (Petranka 1998). Elle a lieu de juillet à septembre en Pennsylvanie (Krzysik 1980), de fin juin à fin août au Tennessee, en Caroline du Nord et en Virginie (Organ 1961, Jones 1986), et s'étend parfois jusqu'en octobre en Alabama et en Indiana (Minton 1972, Mount 1975).

D. ochrophaeus et *D. fuscus* déposent leurs nids sous des roches, des débris ligneux ou dans des dépressions du sol, souvent sur les berges des ruisseaux (Bishop & Chrisp 1933, Krzysik 1980, Jones 1986). Typiquement, les nids de *D. fuscus* se retrouvent à une distance de 1 à 2 m du lit du ruisseau (Petranka 1998), à une distance variant de 30 cm à 1 m de l'eau de surface (Jones 1986), alors que *D. ochrophaeus* montre une plus forte tendance à pondre dans le sol (Keen & Orr 1980).

Chez les salamandres sombres, il existe une corrélation positive entre le nombre d'œufs d'une portée et la taille des individus (Danstedt 1975). Une femelle *D. ochrophaeus* peut pondre de 11 à 14 œufs dans l'état de New York (Bishop 1941) et ce nombre peut s'élever jusqu'à 40 dans le sud de son aire de distribution (Verrell 1989). Chez *D. fuscus*, le nombre d'œufs est également variable, pouvant être compris entre 5 et 33 au Massachussetts (Wilder 1913) ou encore entre 22 et 34 en Pennsylvanie (Hall 1977).

1.3.2.2. Incubation et éclosion des œufs

En milieu naturel, la durée estimée de l'incubation des œufs de ces deux espèces se situe entre 50 et 70 jours (Juterbock 1986, Tilley 1972, Tilley 1973c). Le temps d'incubation

peut différer selon la région ou le site, mais varie également entre les portées (Juterbock 1986). Le développement des œufs est accéléré par des températures plus élevées (Juterbock 1986), mais il est également plus rapide en altitude (Tilley 1973c). Ces observations suggèrent des divergences génétiques entre les populations ou possiblement des abondances de nourriture en altitude suffisamment importantes pour compenser les températures plus faibles et la saison de croissance plus courte (Tilley 1973c). Dans l'état de New York, en Ohio et au Kentucky, les œufs de *D. fuscus* vont éclore entre la fin août et la mi-octobre (Bishop 1941, Orr & Maple 1978, Juterbock 1986). L'éclosion a lieu en août chez *D. ochrophaeus* en Caroline du Nord (Tilley 1972), entre la mi-septembre et le début octobre en Ohio (Keen & Orr 1980, Orr 1989), ainsi qu'en mars, septembre et octobre dans l'état de New York (Bishop 1941).

Les femelles *D. ochrophaeus* et *D. fuscus* offrent des soins parentaux aux œufs jusqu'à leur éclosion (Forester 1979, Forester 1981, Juterbock 1987). Elles assurent ainsi leur défense contre les prédateurs, augmentent leur oxygénation et limitent la dessiccation en restreignant les contacts avec l'air (Forester 1979). Aussi, elles diminuent les infections fongiques par oophagie, en s'alimentant des œufs morts ou infectés, et diminuent le dépôt du vitellus par des vibrations de la mâchoire (Tilley 1972, Forester 1979, Forester 1984, Orr 1989). Il est peu fréquent que les œufs soient abandonnés par la femelle lorsque celle-ci est dérangée (Juterbock 1987). Les femelles demeurent auprès de leur portée tout au long du stade de développement des œufs, malgré de nombreuses perturbations (Juterbock 1987). Même lorsque que le nid est vide, celui-ci n'est abandonné que la moitié du temps lorsque la femelle est perturbée (Juterbock 1987). Les œufs abandonnés meurent dans 100 % des cas alors que les soins apportés par la femelle diminuent ce taux à 47 % (Forester 1979). Il semble que certaines femelles occupent l'endroit de leur futur nid de 14 à 21 jours avant la ponte (Forester 1981).

1.3.2.3. Stade larvaire

À l'éclosion, les larves de *Desmognathus* possèdent des branchies qui persisteront de quelques heures à quelques jours (Bishop 1941). Les juvéniles du genre *Desmognathus* se métamorphosent généralement entre la fin de la deuxième et le début de la troisième année de vie, alors qu'ils mesurent plus de 30 mm (Bishop 1941, Danstedt 1979, Keen & Orr 1980). Selon leur distribution, les larves de *D. fuscus* se métamorphosent de 9 à 14 mois après l'éclosion, alors qu'elles mesurent entre 9 et 20 mm (Organ 1961, Danstedt 1975, Jones 1986, Juterbock 1990). Le stade larvaire de *D. ochrophaeus* peut durer de quelques jours à 8 mois (Bishop & Chrisp 1933, Eaton 1956, Keen & Orr 1890), ou même être absent (Dunn 1917). Selon Organ (1961), le stade larvaire durerait de 10 à 11 mois chez *D. ochrophaeus* et de 13 à 16 mois chez *D. fuscus*.

1.3.2.4. Maturité sexuelle et longévité

L'âge et la taille à la maturité sexuelle diffèrent entre les mâles et les femelles (Organ 1961, Spight 1967, Danstedt 1975, 1979) et varient selon les régions et l'altitude (Tilley 1980). Toutefois, à des altitudes comparables, ils varieront en fonction de l'habitat forestier ou riverain (Tilley 1974). En Ohio et en Pennsylvanie, *D. ochrophaeus* atteint la maturité sexuelle après 3 ou 4 ans (Hall 1977, Keen & Orr 1980). Chez *D. fuscus* les mâles atteignent la maturité sexuelle entre 3 ans et 3 ans et demi (Organ 1961, Spight 1967) alors que les femelles requièrent une année supplémentaire de développement (Organ 1961). En Virginie, la première ponte a lieu chez des groupes de femelles âgées de 5, 7 et 9 ans, où elles atteignent la maturité sexuelle un an après les mâles (Organ 1961). En milieu naturel, la longévité maximale de *D. ochrophaeus* est estimée à environ 15 ans (Orr 1989) ou 7 ans (Desroches & Rodrigue 2004), alors que la durée de vie de *D. fuscus* serait de 10 ans (Desroches & Rodrigue 2004).

1.3.3. Domaine vital et déplacements

Le domaine vital de *D. ochrophaeus* est estimé à 1 m² (Orr 1989). En Ohio, il serait inférieur à 1 m² alors que celui de *D. fuscus* serait inférieur à 3 m² (Barthalamus & Bellis 1969).

D. ochrophaeus se déplace verticalement dans le sol dans certaines conditions environnementales particulières. Par exemple, lorsque la température est élevée ou que le sol s'assèche, il lui arrive de s'enfouir dans le sol jusqu'à une profondeur de 90 cm (Hairston 1949). Un comportement similaire est observable chez la salamandre rayée (*Plethodon cinereus*). Dans des conditions de sécheresse, elle se réfugie dans le sol à une profondeur de plus d'un mètre en évitant toutefois la nappe phréatique (Taub 1961). Jaeger (1971a) mentionne qu'à mesure que le niveau de la nappe phréatique s'élève, la distribution entière de la population de *P. cinereus* se déplace vers la surface. Cette espèce s'enfouit également dans le sol lorsqu'il devient saturé d'eau (Taub 1961).

En plus des déplacements verticaux, des déplacements horizontaux vers des refuges ou des dépressions humides en période de sécheresse sont également observés chez les salamandres (Heatwole 1962). *D. ochrophaeus* peut descendre les cours d'eau lorsque ceux-ci s'assèchent (Organ 1961). Holomuzki (1982) observa que des individus de cette espèce peuvent parcourir des distances importantes pour retourner à leur emplacement initial après avoir été déplacés de 30 m. Barthalamus & Bellis (1969) ont observé le même phénomène chez *D. fuscus*, après un déplacement d'une distance comparable. Sinon, les déplacements moyens de *D. ochrophaeus* entre captures successives sont de l'ordre de 41 à 47 cm avec un maximum de 1,7 m (Huheey & Brandon 1973). Ils seraient plutôt de l'ordre de 2 à 5 m pour *D. fuscus* (Pendlebury 1973, Holomusky 1982). Des déplacements plus importants de *D. fuscus* furent enregistrés, allant jusqu'à 17,1 m sur une période de 24 heures (Barbour *et al.* 1969).

1.3.4. Activité

L'activité des *Desmognathus* est reliée à leur tolérance à la dessiccation (Feder & Londos 1984). Conséquemment, sur une base journalière, l'activité de *D. ochrophaeus* et de *D. fuscus* varie selon l'heure, limitée principalement par la luminosité et les conditions d'humidité (Hairston 1949, Huheey & Brandon 1973, Shealy 1975). Le jour, ces salamandres demeurent sous des abris, dans des refuges ou enfouies dans le sol, là où l'exposition à la lumière et les pertes d'eau sont limitées. La nuit, elles sortent à la surface du sol pour s'alimenter et se reproduire alors que la température est faible, l'humidité élevée et les rayonnements solaires absents (Shealy 1975). De plus, les salamandres sont moins vulnérables aux prédateurs la nuit, en raison de la faible luminosité (Ralph 1957). Sur une base saisonnière, les facteurs les plus significatifs sur l'activité de *D. ochrophaeus* et de *D. fuscus* sont la température et l'humidité du sol (Shealy 1975).

La fréquence et la durée des activités des salamandres sont également limitées par la présence de compétiteurs et de prédateurs. Par exemple, en présence de *D. monticola*, *D. fuscus* s'aventure hors des refuges moins fréquemment et ses activités à la surface s'étendent sur une plus courte période (Keen 1982).

1.3.5. Hybridation et identification morphologique

De nombreux auteurs ont suggéré que *D. ochrophaeus* et *D. fuscus* pouvaient s'hybrider en se basant sur l'observation de spécimens morphologiquement intermédiaires entre les deux espèces (Dunn 1926, King 1939, Hairston 1949, Martof & Rose 1963). Les analyses d'allozymes subséquentes ont confirmé la présence d'hybrides dans des populations sympatriques de l'Ohio, de la Pennsylvanie et du Québec (Karlin & Guttman 1981, Houck *et al.* 1988, Sharbel & Bonin 1992), même s'il s'agit d'un phénomène rare. Le taux d'hybridation des salamandres sombres au Québec serait

effectivement faible; Sharbel *et al.* (1995) n'ayant détecté que 11 hybrides sur 201 spécimens. Par ailleurs, les analyses génétiques ont révélé l'absence d'hybrides de la F1 suggérant des rétrocroisements entre les hybrides et les espèces parentales. Au Québec, des rétrocroisements auraient effectivement lieu, mais uniquement avec *D. ochrophaeus* (Sharbel *et al.* 1995).

Très souvent, les études portant sur l'écologie des salamandres se basent sur des données d'inventaire où les espèces ont été identifiées morphologiquement. Au moins cinq types de patrons dorsaux sont reconnus pour *D. ochrophaeus*, sur la base de caractéristiques des lignes dorso-latérales, de la bande dorsale ou encore des indices mélaniques (Martof & Rose 1963, Tilley 1969, Anderson & Tilley 2003). Des patrons dorsaux typiques pour chacune des espèces ont été identifiés (Tilley 1969). Cependant, les patrons spécifiques ne sont pas les mêmes dans les parties nord et sud de la distribution des espèces (Tilley 1969, Conant & Collins 1998). Par ailleurs, étant donné la très grande variabilité de ces caractères et la possibilité d'hybridation, on retrouve une importante gamme de morphotypes chez ces espèces. Si les espèces pures présentent des patrons dorsaux distinctifs, les hybrides de la F1 devraient présenter une morphologie intermédiaire entre celles-ci, comme les individus observés par Martof & Rose (1963). Conséquemment, les caractères morphologiques devraient permettre l'identification des hybrides. Deux critères morphologiques externes inspirés de ceux proposés par Tilley (1969) et Conant & Collins (1998) peuvent être utilisés pour identifier les salamandres sombres et leurs hybrides. Les caractères se basent sur deux éléments du patron dorsal : les lignes dorso-latérales et la bande dorsale. Typiquement *D. ochrophaeus* possède des lignes dorso-latérales droites (Tilley 1969, Conant & Collin 1998) et une bande dorsale avec des mouchetures plus ou moins de la forme de chevrons, disposées en une seule ligne centrale (Tilley 1969, Figure 1.2a). Chez *D. fuscus*, les lignes dorso-latérales sont irrégulières, sinueuses ou en zigzag et la bande dorsale possède des mouchetures disposées aléatoirement sans structure linéaire (Conant & Collins 1998, Figure 1.2b).

Suivant ces caractères, un spécimen sera identifié comme un hybride s'il partage un des critères distinctifs de chaque espèce (*i.e.* des lignes dorso-latérales droites et une bande dorsale portant des mouchetures désorganisées ou des lignes dorso-latérales sinueuses avec une bande dorsale dont les mouchetures sont disposées en une seule ligne centrale).

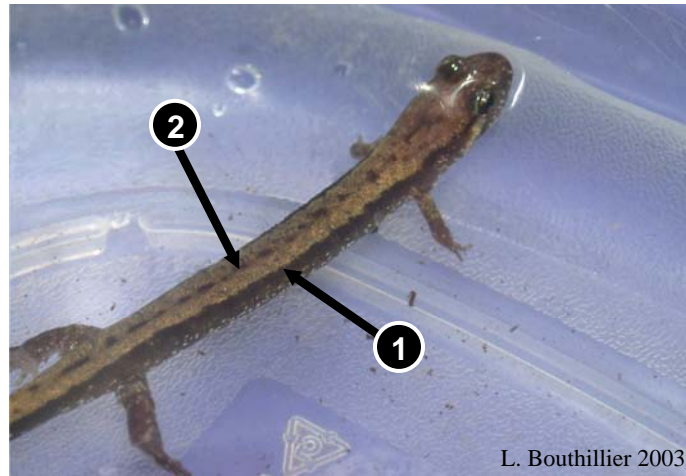
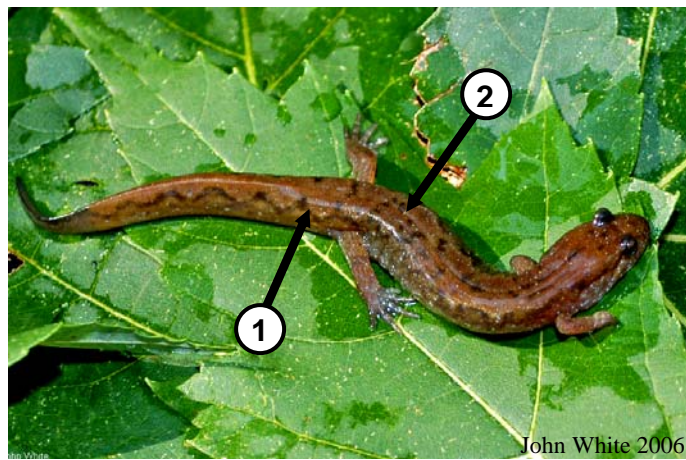
a)*b)*

Figure 1.2. Identification morphologique de *a) Desmognathus ochrophaeus* et *b) Desmognathus fuscus* à partir de la forme des lignes dorso-latérales (1) et des caractéristiques de la bande dorsale (2).

1.4. ÉCOLOGIE DES PLÉTHODONTIDÉS

1.4.1. Compétition

La compétition est l'un des principaux facteurs expliquant la structure des communautés de salamandres et la sélection d'habitat par les différentes espèces (Hairston 1949, Jaeger 1971*b*, Grover 2000). Plusieurs auteurs ont décrit une ségrégation écologique spatiale ou comportementale chez les salamandres coexistant dans un même environnement comme une stratégie d'évitement de la compétition (Jaeger 1971*b*, Fraser 1976, Keen 1982, Roudebush & Taylor 1987). Ce phénomène peut se traduire, entre autres, par une utilisation différentielle des refuges ou par une alimentation et des périodes d'activité différentes. Cela fut observé chez *D. fuscus* (Keen 1982, Grover 2000), *D. monticola* (Colley *et al.* 1989) et *P. cinereus* (Fraser 1976), une espèce compétitrice de *D. ochrophaeus* (Organ 1961, Smith & Pough 1994). Krzysik (1979), mentionne que *D. ochrophaeus* possède une niche écologique dont l'amplitude est réduite lorsqu'il vit en sympatrie avec des espèces compétitrices. Effectivement, en présence de *D. fuscus*, *D. ochrophaeus* utilise un substrat plus sec et plus fin, en plus de se retrouver à une plus grande distance de l'eau (Krzysik 1979). D'autres ont rapporté des changements dans le développement larvaire pour éviter la compétition (Orr & Maple 1978). Une ségrégation spatiale se fait également entre les différents stades chez une même espèce. Chez *D. ochrophaeus*, les juvéniles utilisent des abris plus petits que les adultes (Krzysik 1979). L'utilisation différentielle de l'habitat par les larves et les adultes a également été rapportée pour *D. fuscus* (Grover 2000) et *D. monticola* (Roudebush & Taylor 1987, Colley *et al.* 1989) et demeure une stratégie efficace pour limiter la compétition intraspécifique.

1.4.2. Prédation

La prédation est aussi importante que la compétition dans la sélection de l'habitat des salamandres et les espèces réagissent de la même façon à cette pression en évitant le chevauchement des niches écologiques (Hairston 1987). Parmi les prédateurs reconnus de *D. ochrophaeus* et *D. fuscus*, on retrouve la salamandre pourpre (*G. porphyriticus*), une salamandre de ruisseaux de grande taille (Tilley 1973b, Uzendoski *et al.* 1993, Hileman & Brodie 1994). Par ailleurs, les salamandres sombres sont aussi victimes des couleuvres, des petits mammifères et des oiseaux (Bishop 1941, Hom 1988, Orr 1989, Whiteman & Wissinger 1991, Petranka 1998). Il semble que la prédation intraspécifique soit également présente chez certaines salamandres (Pendlebury 1973). Il semblerait que *D. ochrophaeus* défend ses œufs efficacement contre les congénères homosécifiques et les salamandres de petite taille, mais demeure inefficace contre les prédateurs mesurant plus du tiers de sa taille (Forester 1979). Contrairement à d'autres, les salamandres du genre *Desmognathus* ne possèdent pas de sécrétions cutanées toxiques pour repousser les prédateurs (Brodie 1977). Cependant, elles peuvent reconnaître les signaux chimiques laissés au sol par des congénères blessés ou par certains prédateurs comme les couleuvres (Cupp 1994, Luttershmidt *et al.* 1994). De plus, l'amputation spontanée de la queue, l'autotomie, semble être une stratégie antiprédateur efficace chez plusieurs espèces (Whiteman & Wissinger 1991).

1.4.3. Ségrégation spatiale des espèces dans l'habitat

Les Pléthodontidés se distribuent dans l'habitat selon un gradient d'humidité, du milieu aquatique au milieu terrestre (Hairston 1987, Grover 2000, Grover & Wilbur 2002, Petranka & Smith 2005). Ce gradient résulte d'un évitement de la prédation et de la compétition, mais dépend également des exigences écologiques de chaque espèce (Grover 2000). Il est reconnu que dans les communautés de salamandres, les plus grosses espèces aquatiques vont repousser les plus petites espèces vers les habitats

terrestres (Hairston 1949, Smith & Pough 1994). Cette observation est également vraie pour les *Desmognathus* qui sont plutôt des salamandres semi-aquatiques (Petranka 1998). Il en résulte un gradient de terrestrialité suivant la taille décroissante des espèces : *D. quadramaculatus* > *D. monticola* > *D. fuscus* > *D. ochrophaeus* > *D. welteri*, où *D. quadramaculatus* est l'espèce la plus aquatique (Hairston 1980, Carr & Taylor 1985, Southerland 1986a, 1986c). La ségrégation spatiale des espèces au sein de la communauté est telle qu'elle minimise le chevauchement des niches écologiques (Grover, 2000).

1.4.4. Exigences écologiques

Les niches écologiques des salamandres sont grandement affectées par la prédation et la compétition, mais sont également définies par un ensemble de caractéristiques environnementales offrant des conditions d'humidité (Grover 2000, Grover & Wilbur 2002) ou d'alimentation (Hairston 1949) qui assurent leur survie. Différentes études ont validé l'importance de nombreux facteurs environnementaux sur la survie, la distribution, l'abondance et la richesse d'espèces, terrestres ou aquatiques (Southerland 1986b, Davic *et al.* 1987, Gibbs 1998, Grover 2000, Young & Yahner 2003, Grant *et al.* 2005).

Puisque les Pléthodontidés possèdent une respiration cutanée (Noble 1913), leur peau doit demeurer humide en permanence afin d'assurer les échanges gazeux (Feder 1983). Les salamandres sombres sont beaucoup plus sensibles à la dessiccation que d'autres Pléthodontidés terrestres comme *Plethodon cinereus* (Spotila 1972). Au sein du genre, *D. ochrophaeus* serait particulièrement vulnérable à la dessiccation puisqu'il possède une moins grande tolérance aux températures élevées et un taux de réhydratation plus lent que *D. fuscus* (Spotila 1972). Conséquemment, leur sélection d'habitat est reliée à leur tolérance à la dessiccation (Feder & Londos 1984). Pour ces raisons, les conditions

de température, l'humidité de l'air et les précipitations sont très importantes pour ces espèces (Heatwole & Lim 1961, Heatwole 1962, Fraser 1976, Jaeger 1971a) qui se montrent sensibles au rayonnement solaire (Heatwole 1962). Les facteurs hydrologiques influencent également l'abondance et la diversité des salamandres (Southerland 1986b, Krzysik 1979, Jung *et al.* 2000). Durant le jour, les salamandres demeurent sous des abris, dans des refuges ou enfouies dans le sol afin de limiter les pertes d'eau et l'exposition à la lumière (Shealy 1975). Ainsi, l'habitat des salamandres doit offrir des abris, des refuges et un certain couvert végétal pour limiter le rayonnement solaire au sol ainsi que maintenir l'humidité et la température du milieu à des niveaux acceptables pour la survie des salamandres (Shealy 1975, Krzysik 1979, Jung *et al.* 2000). Le type de substrat affecte aussi l'utilisation de l'habitat par les salamandres (Hawkins *et al.* 1983, Herrington & Larsen 1985); certains par leur capacité à retenir l'humidité, d'autres parce qu'ils offrent des meilleures conditions pour l'alimentation (Jaeger *et al.* 1995) ou encore parce qu'ils offrent une bonne protection contre les prédateurs (Moore *et al.* 2001). Alors que la disponibilité des abris est essentielle à la présence des salamandres, la taille et le type des abris permettent de discriminer les niches écologiques de nombreuses espèces (Organ 1961, Krzysik 1979, Keen 1982, Grover 2000). D'autres variables abiotiques, telles que le pH, sont discriminantes pour la présence des salamandres. Par exemple, *P. cinereus* est exclu des habitats de faible pH alors qu'un pH de 3 à 4 lui est létal (Wyman & Hawksley-Lescault 1987). Ainsi, *P. cinereus* est absent des sols des forêts de conifères (Wyman & Hawksley-Lescault 1987). Finalement, Gibbs (1998) mentionne que les populations d'amphibiens ne peuvent persister sous un couvert forestier inférieur à 50 %. De même, la densité des salamandres augmente en fonction de la superficie de la forêt résiduelle et diminue avec la fragmentation du milieu.

1.5. PROBLÉMATIQUE

Parmi les dix espèces de salamandres présentes au Québec, au moins sept espèces sont retrouvées à Covey Hill; une colline de la Montérégie, située dans les contreforts des Adirondacks, à près de 3 km au nord de la frontière de l'état de New York. Certaines espèces sont étroitement associées aux ruisseaux : (1) la salamandre sombre du nord (*Desmognathus fuscus*), (2) la salamandre sombre des montagnes (*Desmognathus ochrophaeus*), (3) la salamandre à deux lignes (*Eurycea bislineata*) et (4) la salamandre pourpre (*Grinophilus porphyriticus*). Trois espèces principalement forestières habitent également ce secteur : (5) la salamandre rayée (*Plethodon cinereus*), (6) la salamandre maculée (*Ambystoma maculatum*) et (7) la salamandre à points bleus (*Ambystoma laterale*). Finalement, des hybrides *D. ochrophaeus* × *D. fuscus* sont également présents au sein de la communauté de salamandres de Covey Hill.

De par sa biodiversité, ce secteur est très intéressant pour l'étude d'une communauté de salamandres, d'autant plus qu'il s'agit du seul endroit au Canada où l'on retrouve *D. ochrophaeus*, exception faite d'une observation à Niagara Falls en Ontario (comm. pers. Jacques Jutras 2005). La distribution canadienne de cette espèce est inférieure à 50 km² (Alvo & Bonin 2003). En raison de sa distribution restreinte et des menaces qui compromettent le maintien des populations et de ces habitats, *D. ochrophaeus* apparaît sur la liste des espèces désignées menacées du Comité sur le Statut des Espèces en Péril au Canada (COSEPAC) depuis 2001. Au Québec, *D. ochrophaeus*, *D. fuscus* et *G. porphyriticus* sont des espèces susceptibles d'être désignées menacées ou vulnérables selon le Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec (MRNF).

À l'heure actuelle, la survie des populations de salamandres de ruisseaux et la conservation de leurs habitats sont largement compromis par de nombreux facteurs. Parmi ceux-ci on compte l'exploitation des réserves d'eaux souterraines, les

modifications du régime hydrique ou de la qualité des eaux, la déforestation et les activités agricoles ou récréatives (Jutras 2003). En raison des pressions croissantes sur l'habitat des salamandres de ruisseaux, un plan d'intervention a été mis de l'avant par le MRNF, conjointement avec de nombreux intervenants, dont l'organisme Conservation de la nature (Jutras 2003). Ce plan vise *D. ochrophaeus*, *D. fuscus*, *G. porphyriticus* et *E. bislineata*, et il compte parmi ses objectifs celui d'élargir les connaissances actuelles sur l'habitat de ces espèces afin de les protéger et d'assurer le maintien des populations existantes (Jutras 2003). La situation précaire de *D. ochrophaeus* et le manque d'information sur son habitat à nos latitudes en font une espèce prioritaire dans le plan d'intervention. Bien que la situation précise de chacune de ces espèces ne soit pas aussi critique, elles dépendent toutes du même milieu et nécessitent le maintien de la qualité des ruisseaux pour survivre.

Suivant les priorités du plan d'intervention, ce projet de maîtrise vise d'abord l'acquisition de connaissances sur l'habitat des salamandres de ruisseaux au Québec. Cependant, étant donné les relations écologiques complexes entre les espèces de salamandres qui vivent en sympatrie, la caractérisation de l'habitat doit tenir compte des interactions possibles avec toutes les autres salamandres de la communauté, en considérant à la fois les composantes environnementales, spatiales et biotiques. Cette étude s'intéresse donc à la communauté entière de salamandres associées aux ruisseaux de Covey Hill.

Très souvent, les études portant sur l'écologie des salamandres se basent sur des données d'inventaire où les espèces furent identifiées morphologiquement. Cependant, il existe une très grande variation morphologique au sein des *Desmognathus* ce qui rend l'identification des espèces difficile (Martof & Rose 1963, Anderson & Tilley 2003). Conséquemment, il est possible que *D. ochrophaeus* et *D. fuscus* soient confondus lors de leur identification sur la base de critères morphologiques. Par ailleurs, l'hybridation

possible entre les espèces devrait, pour la F1, engendrer des individus morphologiquement intermédiaires entre les espèces parentales. Cependant, le phénomène de rétrocroisement entre les hybrides et les espèces parentales risque d'altérer le signal morphologique, spécialement si les hybrides se reproduisent uniquement avec *D. ochrophaeus* tel que rapporté au Québec (Sharbel *et al.* 1995). Dans ce cas, les hybrides ressembleraient davantage à cette espèce parentale au fil des générations.

Lors des inventaires de salamandres, l'identification morphologique des espèces est couramment utilisée puisqu'elle peut se faire sur place, rapidement, ne requiert ni sacrifice, ni amputation de l'animal et demeure peu coûteuse. Les salamandres peuvent être retournées à l'endroit exact de leur capture et ce, quelques minutes après avoir été prélevées. L'identification génétique par contre est beaucoup plus efficace et donne des résultats extrêmement fiables et précis. Cependant, l'identification génétique ne peut être réalisée sur le terrain, elle est plus laborieuse, nécessite des prélèvements de tissus et s'avère plus dispendieuse. Dans une optique de conservation spécifique à *D. ochrophaeus*, il est impératif d'identifier l'espèce sans ambiguïté afin de caractériser son l'habitat et déterminer sa distribution actuelle. Il est important de déterminer si l'identification morphologique est valable en comparaison à l'identification génétique. Dans un second volet, ce projet veut évaluer la pertinence des critères morphologiques pour identifier les salamandres sombres et leurs hybrides au Québec, et ainsi déterminer si l'identification génétique est nécessaire.

Les deux principaux objectifs de ce projet sont donc de: (1) caractériser l'habitat de la communauté de salamandres de ruisseaux de Covey Hill, en portant une attention particulière aux exigences écologiques des salamandres sombres et de leurs hybrides, et (2) valider l'identification morphologique de *D. ochrophaeus*, de *D. fuscus* ainsi que de

leurs hybrides à partir de méthodes moléculaires. Afin de répondre aux objectifs de recherche, quatre questions spécifiques ont été formulées.

Les espèces de la communauté de salamandres de Covey Hill utilisent-elles des habitats différents ?

La compétition, la prédation et les conditions environnementales sont les principaux facteurs affectant la ségrégation de niche des espèces au sein d'une communauté de salamandres (Hairston 1987). Les espèces sont reconnues pour se répartir dans l'habitat suivant un gradient d'habitat aquatique à terrestre (Organ 1961, Hairston 1980, 1986). Par ailleurs, de nombreuses variables biotiques et abiotiques affectent autant la présence, l'abondance et la diversité des salamandres (Southerland 1986b, Young & Yahner 2003, Grant *et al.* 2005). Si les salamandres à l'étude occupent effectivement des niches écologiques distinctes, on s'attend donc à ce que les variables environnementales mesurées permettent de discriminer les sites en fonction des espèces qui s'y trouvent. Par ailleurs, des niches écologiques différentes pour chaque espèce devraient s'expliquer par les pressions de compétition et de prédation au sein de l'habitat et elles devraient s'organiser le long d'un gradient d'humidité, si les variables mesurées sont discriminantes.

Les hybrides utilisent-ils les mêmes habitats que les espèces parentales ?

Il est probable que les hybrides utilisent des habitats différents des espèces parentales si ce phénomène leur procure un avantage physiologique (*fitness* plus élevé), comme ce fut observé chez d'autres espèces d'amphibiens (Parris 2001, Pfenning 2003). Par ailleurs, il est possible que la ségrégation spatiale des hybrides suive le sens de l'hybridation. En effet, puisque les femelles *Desmognathus* prodiguent des soins parentaux à leur portée, et qu'elles retournent pondre à l'endroit où elles sont nées (Forester 1977), il est possible que les hybrides de la F1 utilisent les mêmes habitats que l'espèce maternelle.

La distribution des salamandres de Covey Hill varie-t-elle au cours de la saison ?

Dans des conditions d'habitat défavorables, les salamandres peuvent effectuer des migrations importantes vers des refuges humides, afin d'éviter la déshydratation (Heatwole 1962). Étant donné que les caractéristiques de l'habitat varient en fonction des fluctuations du régime hydrique ou des conditions climatiques, il est possible d'envisager que la distribution des salamandres se déplace entre les mois de mai et de septembre. Des variations saisonnières dans la distribution des salamandres ont d'ailleurs été rapportées dans plusieurs études (Organ 1961, Martof & Rose 1963, Moore *et al.* 2001).

L'identification des salamandres sombres et des hybrides à partir des critères morphologiques est-elle adéquate ?

Les critères morphologiques utilisés pour distinguer les deux espèces et identifier les hybrides sont adéquats, si et seulement si l'identification morphologique concorde avec l'identification moléculaire. Nos travaux permettront de valider deux critères d'identification morphologiques basés sur des éléments du patron dorsal, soit les lignes dorso-latérales et la bande dorsale, utilisés pour discriminer les hybrides des espèces parentales.

1.6. ORGANISATION DU MÉMOIRE

Les deux chapitres qui suivent présentent, sous la forme d'articles scientifiques rédigés en anglais, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet. Le premier discute de la sélection de l'habitat par la communauté de salamandres de ruisseaux de Covey Hill comprenant *D. ochrophaeus*, *D. fuscus* et des hybrides de ces espèces. Le second, quant à lui, propose une méthode moléculaire d'identification des salamandres sombres et de leurs hybrides, qui a permis de valider deux caractères morphologiques communément utilisés pour discriminer ces espèces.

CONTRIBUTION DES COAUTEURS

Chacun des articles cosignés, présentés dans ce mémoire, est issu entièrement de mon travail original, spécifique et indépendant, réalisés dans le cursus de ma maîtrise. D'abord, les analyses réalisées sont basées sur les données d'un inventaire que j'ai réalisé en 2004 sous la supervision de mon directeur de recherche, François-Joseph Lapointe. Mon apport à ces articles a été à tous les niveaux, soit la revue de la littérature, l'analyse des données, l'interprétation des résultats et la rédaction. Le rôle de mon superviseur dans ce processus a surtout concerné la planification et la supervision des inventaires et des analyses, ainsi que les corrections de la forme et du contenu des versions antérieures.

CHAPITRE 2:
HABITAT SELECTION IN A STREAM SALAMANDER
COMMUNITY INCLUDING *DESMOGNATHUS* HYBRIDS

Cet article sera soumis prochainement :

Boutin, A. & F.-J. Lapointe. 2006. Habitat selection in a stream salamander community including *Desmognathus* hybrids.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Anaïs Boutin,

2-335-1-0 M.Sc. en Sciences Biologiques

2. Description de l'article

Cet article sera soumis prochainement :

Boutin, A. & F.-J. Lapointe. 2006. Habitat selection in a stream salamander community including *Desmognathus* hybrids.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Anaïs Boutin inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation de l'habitat d'une communauté de salamandres de ruisseaux comportant des hybrides».

François Joseph Lapointe

Coauteur

Signature

Date

2.1. RÉSUMÉ

Nous avons étudié une communauté de salamandres incluant des hybrides du genre *Desmognathus* à Covey Hill (Canada), où les salamandres sombres atteignent la limite nord de leur distribution. La caractérisation d'habitat a été réalisée par un échantillonnage mensuel de 63 sites entre mai et septembre 2004. L'analyse canonique des correspondances a révélé que l'abondance des espèces était reliée à 18 variables environnementales et les ordinations ont illustré une ségrégation des niches écologiques de *D. ochrophaeus* et *D. fuscus*. Cette ségrégation a été interprétée en fonction de la compétition et de la prédation entre les espèces et les tests de Mantel ont suggéré une réduction de ces pressions en septembre, lors de la période de reproduction. Les analyses multivariées ont également révélé que les hybrides *Desmognathus* utilisent des habitats similaires à ceux de *D. ochrophaeus* tout au long de la saison, probablement parce qu'ils sont génétiquement plus semblables à cette espèce parentale.

2.2. ABSTRACT

We studied a community of stream salamanders including *Desmognathus* hybrids, in Covey Hill (Canada) where the dusky salamanders reach their northernmost distribution. Habitats were characterized by monthly surveys of 63 sites between May and September 2004. Canonical correspondence analysis revealed that the species abundances were related to 18 environmental variables and ordinations revealed a discrimination between the ecological niches of *D. ochrophaeus* and *D. fuscus*. The niche segregation was interpreted with respect to competition and predation among species and Mantel tests suggested a reduction of these pressures in September, during the breeding period. The multivariate analyses also revealed that *Desmognathus* hybrids use similar habitats to those of *D. ochrophaeus* during the season, probably because hybrids are more closely related genetically to this parental species.

2.3. INTRODUCTION

Salamander community ecology has been widely studied in the Appalachian Mountains (Hairston 1949, Organ 1961, Krzysik 1979, Petranka & Smith 2005), where habitat selection, abundance, and species richness of both terrestrial and streamside species were influenced by many different environmental factors (Southerland 1986*b*, Davic *et al.* 1987, Gibbs 1998, Grover 2000, Young & Yahner 2003, Grant *et al.* 2005). Patterns of segregation in aquatic to terrestrial habitats are in part mediated by competition and predation (reviewed by Hairston 1987). In the presence of such factors, sympatric salamanders undergo ecological shifts (*e.g.* in spatial distribution, habitat use, foraging habits, activity patterns) towards less optimal conditions (Fraser 1976, Southerland 1986*a*, 1986*c*, Grover 2000).

Studies of species interactions in the Plethodontidae family have clarified how salamander communities are structured along environmental gradients (reviewed by Hairston 1987). Plethodontid salamanders are characterized by the absence of lungs in adults (Noble, 1931); gas exchanges are accomplished through the permeable skin and the buccopharyngeal mucous membranes (Whitford & Hutchison 1967, Gatz *et al.* 1975, Feder & Burggren 1985). This allows them to use more terrestrial habitats, but it limits their distribution to humid sites with abundant moist retreats (Spotila 1972, Feder 1983, Grover 1998). Keeping the skin moist is critical to plethodontid salamanders since it insures effective respiration; yet, their skin has a low resistance to water loss by evaporation (Spight 1967, 1968, Spotila 1972, Spotila & Berman 1976). Within a stream salamander community, the more aquatic species can exclude terrestrial-tolerant species from their optimal habitats (Hairston 1949, Smith & Pough 1994, Grover 2000). Despite strong competition and predation pressures, terrestrial salamanders can tolerate dehydration rates that are lethal to most aquatic species (Thorson & Svihla 1943, Littleford *et al.* 1947). They can also rehydrate more rapidly than the further aquatic species and therefore may circumvent these pressures (Brown *et al.* 1977, Grover 2000).

While assessing the streamside habitat use of Appalachian salamanders, Petranka & Smith (2005) encountered many hybrid salamanders in contact zones among members of the *Desmognathus ochrophaeus* complex (*D. ochrophaeus*, *D. ocoee*, *D. carolinensis*, *D. orestes* and *D. imitator*) and between members of the *Desmognathus fuscus* complex (*D. fuscus* and *D. santeetlah*). These authors treated all interbreeding species of a complex and their hybrids together as a single entity, assuming that they have nearly identical ecological requirements and lifestyles. Hybridization between the Allegheny mountain dusky salamander (*Desmognathus ochrophaeus*) and the Northern dusky salamander (*D. fuscus*) was suggested in several localities of the Eastern United States, first based on morphological variation and further validated by genetic analyses (Dunn 1926, King 1939, Martof & Rose 1963, Karlin & Guttman, 1981). Hybridization between these two species is also known to occur in Québec (Sharbel & Bonin 1992, Sharbel *et al.* 1995).

In this paper, we determine the ecological correlates within a salamander community composed of five species that inhabit the streams of Covey Hill. We hypothesize that all species segregate along a moisture gradient and have distinct ecological niches, following their specific habitat requirements. We also evaluate the position occupied by *D. fuscus* × *D. ochrophaeus* hybrids along the environmental gradient, and their ecological interactions with the other species. Since these hybrids are derived from interbreeding members of two different complexes, they may exploit differential niches than their parental species. We hypothesize that hybrids may have similar fitness to *D. ochrophaeus* because they are more closely related to this species. Hence, hybrids may use the same habitats as *D. ochrophaeus*, or even outperform this parental species if their adaptive ability has been effectively increased. Under such a scenario, hybrids may be more competitive, use environmental resources more efficiently, and tolerate harsher ecological conditions than their progenitors. This may lead to the use of novel habitats by hybrid salamanders.

2.4. METHODS

2.4.1. Salamander survey

Salamanders and their habitats were surveyed in the Covey Hill region of Québec (Canada), on the outskirts of the Adirondack piedmont, close to the border with New York State. The Covey Hill area corresponds to the northernmost limit of *D. ochrophaeus* and *D. fuscus* distributions in Eastern North America. These two species are the only representatives of the genus that can be found in Canada (Figure 2.1.). A total of 63 sites were sampled on a monthly basis, between May and September 2004.

We assessed the habitat preferences within the salamander community, giving special attention to the position of *Desmognathus* hybrids. The species included the Spring salamander (*Gyrinophylus porphyriticus*), the Northern two-lined salamander (*Eurycea bislineata*), the Allegheny mountain dusky salamander (*Desmognathus ochrophaeus*) and the Northern dusky salamander (*Desmognathus fuscus*), as well as the Eastern red-backed salamander (*Plethodon cinereus*), the Blue-spotted salamander (*Ambystoma laterale*) and the Spotted salamander (*Ambystoma maculatum*).

Salamanders were found during time-constrained searches of one hour. These searches were executed over 25 m stream portions and extended over the entire width of the riverbed plus an additional 2 m of the riverbanks. All ground-cover (e.g. rocks, bark, wood debris) was turned, and litter and soil cavities were searched. All specimens captured were identified to species then released at their point of capture. A total of 29 environmental variables were recorded at each site upon each visit. Details of these variables are provided in Table 2-I (see also Appendix I).



Figure 2.1. Distribution of *Desmognathus fuscus* and *D. ochrophaeus* in North America, with the study area of Covey Hill (Québec) indicated. Modified from Conant & Collins (1998).

Table 2-I. Details of the environmental variables measured at each site.

VARIABLE	DETAILS	MESUREMENT UNITS AND CATEGORIES FOR MULTICLASS VARIABLES
<i>Air temperature</i>	At center of site, at 30 cm above ground, in the shade	°C
<i>Air humidity</i>	At center of site, at 30 cm above ground, in the shade	%
<i>Rainfall</i>	At moment of survey	presence/absence
<i>GPS coordinates</i>	At start of transect	NAD 83, dd. mm. ss.s
<i>Stream width</i>	Average streambed width	< 0.5, 0.5-1, 1-2, 2-4, > 4 m
<i>Surface covered by water</i>	Surface of streambed covered by water	%
<i>Water flow</i>	Distance for which water flows linearly without interruption, in percent of the site length	< 10, 20-40, 40-60, 60-80, 80-100 %
<i>Depth of underground water</i>	Depth at which water appears in ground when water flow is under 10 %, measured at every 5 m	< 10, 10-20, 20-30, > 30 cm
<i>Water depth</i>	Maximum water depth	0-10, 10-20, 20-30, 30-50, > 50 cm
<i>Water pH</i>	At maximum depth	-
<i>Water temperature</i>	At maximum depth and fastest current	°C
<i>Speed of water flow</i>	Relative abundances of 3 speed categories:	%

slow, moderate and fast

Table 2-I (Continued). Details of the environmental variables measured at each site.

VARIABLE	DETAILS	MESUREMENT UNITS AND CATEGORIES FOR MULTICLASS VARIABLES
<i>Substrate composition</i>	Relative abundances of 7 substrate categories: Bedrock, Large rocks (size > 20 cm), Small rocks (size < 20 cm), Pebbles (size < 0.4 cm), Sand, Organic matter (litter, wood debris, etc) and Clay (including silt)	%
<i>Soil pH</i>	In the most abundant class of substrate other than bedrock, large rock or small rock.	-
<i>Soil humidity</i>	Soil humidity when surface covered by water = 0%	Scale from 1 to 10
<i>Vegetation cover</i>	Relative abundances of 3 vegetation categories : Tree canopy (Trees > 2 m), Shrub cover (Trees < 2 m) and Herbaceous cover	0-20, 20-40, 40-60, 60-80, 80-100 %
<i>Moss</i>	Surface of site covered by moss	%
<i>Crawfish</i>	Observed on site	Number
<i>Fish</i>	Observed on site	Number

2.4.2. Statistical analyses

2.4.2.1. Canonical analyses

Canonical correspondence analysis (CCA) (ter Braak 1986, ter Braak & Prentice 1988) using CANOCO 3.12 console version (ter Braak 1987) was used to evaluate the relationships between salamander abundances and the environmental conditions revealed by 29 explanatory variables, measured on five successive months. CCA was preferred to RDA (Redundancy analysis) because we are mostly dealing with rare species.

Prior to the analysis, sites containing no salamanders were excluded for each month. Hence, 46 sites were retained for the month of May, 47 for June, 55 for July, 57 for August, and 59 for September. As well, the variables for which over 25% of the sites contained missing data were excluded from the analyses in order to preserve as many data rows (sites) as possible in the data tables; missing data are not allowed in the CANOCO implementation of CCA. Variables with limited missing data were estimated using regression models, when the R^2 of the model was larger than 0.95. Between 26 and 29 variables were considered for analyses. Forward selection was used to (1) select the environmental variables that explain best the species abundances data, (2) rank the explanatory variables in order of importance, and (3) determine the statistical significance of the explanatory variables (ter Braak & Smilauer 1998). The proportion of loadings of the constrained eigenvalue on the total variance (trace) (R^2) was used to determine the relationships between the species abundances observed and the environmental variables. Permutations tests (999 perm.) were conducted to determine the significance of the explanatory variables. All variables significant at the $\alpha = 0.05$ level were retained for further analysis, including those that allowed us to include subsequent significant variables. The contribution of each environmental variable to the total inertia of species abundance was estimated with R^2 and adjusted R^2 (R^2_a) values (Peres-Neto *et al.* in press).

Subsequent monthly CCA were computed on the subsamples of environmental variables selected for each month. The global significance of the model and the canonical axes were tested by permutations (999 perm.) and the results of these analyses were represented in dispersion diagrams of the two first canonical axes.

2.4.2.2. Mantel tests among similarity matrices

Mantel tests (1967) were used to compare the monthly surveys to one another and assess whether species abundances or composition changed according to months. To do so, similarity matrices were calculated among the 63 sites on the species abundance data for each month using the Steinhaus coefficient (Motyka 1974) that accounts for species abundances, as well as the coefficient proposed by Sokal & Sneath (1963) for presence/absence data.

Sokal & Sneath (1963) coefficient of similarity: $S(x_1, x_2) = a + d / b + c$

a: number of descriptors for which the two objects are coded 1

b and c: number of descriptors for which the two objects are coded differently

d: number of descriptors for which the two objects are coded 0

Gower's coefficient (Gower 1971) was used for computing similarity matrices for environmental data. Partial Mantel tests (Smouse *et al.* 1986) were also conducted using a matrix of geographical distances as covariable to account for the spatial distribution of the sites. The Mantel statistic was tested with 999 permutations; a Bonferonni correction was used to correct p-values for multiple tests (Rice 1989).

Principal coordinate analyses (PCoA) were performed on the Mantel statistics and among-month variability was represented on the first two principal coordinate axes (Gower 1966). Similarity matrices, geographical distance matrices, Mantel tests and PCoA were computed using the R package version 4.0 (Casgrain & Legendre 2001).

2.5. RESULTS

2.5.1. Salamander survey

During the 36 sampling days required to survey the sites on five successive months, 1198 specimens were captured, including 97 *Desmognathus ochrophaeus*, 493 *Desmognathus fuscus*, 54 *Plethodon cinereus*, 441 *Eurycea bislineata*, and 54 *Gyrinophylus porphyriticus*. A total of 59 *Desmognathus* hybrids were identified among the specimens captured, using dorsal morphological patterns that were intermediate to those of the parental species. Two *Ambystoma laterale* and one *Ambystoma maculatum* were also caught; these specimens were excluded from the analysis. 62 salamander nests were observed during the reproduction period in September.

2.5.2. Statistical analysis

2.5.2.1. Environmental variables

The whole set of environmental variables explained between 52% and 77% of the species abundance variation, depending on the month (Table 2-II). Significant variables were then selected for each month, using the forward selection procedure available in CANOCO. Thus, 18 variables were included in the analyses of at least one month. Analyses using these subsets of variables exhibited contributions to the explanation of species abundances ranging from 21% to 49% (Table 2-II). Some variables such as organic matter, stream width, water temperature, depth of underground water, had significant effects on more than three months, whereas other variables, including small rock, water pH, water flow and presence of rainfall, showed significant effects in only one month (Table 2-III). The CCA results further revealed the relationships between the species abundances and the significant environmental variables selected for different months.

Table 2-II. Total inertia of species abundances explained by the environmental variables for all explanatory variables and the ones selected in the model.

MONTH	BEFORE SELECTION			AFTER SELECTION		
	Nb	R ²	R ² a	Nb	R ²	R ² a
MAY	26	0.7740	0.3241	9	0.4865	0.2913
JUNE	26	0.7205	0.3154	7	0.4267	0.2942
JULY	26	0.5283	0.0767	3	0.2158	0.1711
AUGUST	28	0.5903	0.1239	6	0.2669	0.1970
SEPTEMBER	29	0.6244	0.2986	9	0.4498	0.3601

Table 2-III. Proportions of the species variation explained by the selected environmental variables for each month. The reported values depend on the order of inclusion of the variables in the model. Some variables were excluded because of missing data (n/a) whereas others were not retained by the forward selection procedure (-).

TYPE	VARIABLE	MONTH				
		MAY	JUNE	JULY	AUG.	SEPT.
Weather conditions	<i>Air humidity</i>	-	0.0616	-	0.0353	-
	<i>Rainfall</i>	-	-	-	-	0.1645
Vegetation cover	<i>Shrub cover</i>	-	-	-	0.0353	-
Substrate composition	<i>Bed rock</i>	-	0.0440	0.0385	-	-
	<i>Large rock</i>	0.0405	0.0528	-	-	-
	<i>Small rock</i>	0.0270	-	-	-	-
	<i>Organic matter</i>	0.1307	-	0.1426	0.0628	0.0774
	<i>Moss</i>	0.0360	-	-	-	0.0242
pH	<i>Soil</i>	-	n/a	-	0.0392	0.0193
	<i>Water</i>	0.0901	n/a	-	-	-
Hydrology	<i>Stream width</i>	0.0315	0.1187	-	0.0432	-
	<i>Water depth</i>	n/a	0.0352	0.0347	n/a	-
	<i>Depth underground water</i>	0.0451	0.0528	n/a	n/a	0.0242
	<i>Water temperature</i>	-	0.0616	-	0.0864	0.0242
	<i>Water flow</i>	0.0360	-	-	-	-
	<i>Slow stream flow</i>	0.0496	-	-	-	0.0193
	<i>Moderate stream flow</i>	-	-	-	-	0.0580
	<i>Soil humidity</i>	n/a	n/a	n/a	-	0.0387
TOTAL R ²		0.4865	0.4267	0.2158	0.3022	0.4498

2.5.2.2. Canonical analyses

In May, abundances of *E. bislineata* were strongly correlated with the presence of large rocks, continuous water flow and a larger stream width, whereas *D. ochrophaeus* and *P. cinereus* exhibited similar ecological niches associated with drier, smaller streams with organic matter and a less continuous water flow (Figure 2.2a). *D. fuscus* and *G. porphyriticus* occupied similar habitats that contrasted with those of *Desmognathus* hybrids. Habitats of *D. fuscus* were characterized by slower streams, while *G. porphyriticus* was associated with the presence of small rocks.

In June, the ordination is characterized by the same grouping of species. For this month, the projection of *D. ochrophaeus* was almost superimposed to that of *P. cinereus*, and these species shared similar ecological niches with *Desmognathus* hybrids (Figure 2.2b). These species were still associated with smaller, cooler and shallower streams that had intermittent water flow, deeper underground water and large rocks. *G. porphyriticus* was associated with a bedrock substrate, as was *D. fuscus*, to a lesser extent. The later was associated with larger and warmer streams. *E. bislineata* was almost orthogonal to all the other species, suggesting a niche segregation between the stream salamanders. The habitat of *E. bislineata* was characterized by larger, warmer and deeper streams.

In July, only the first canonical axis was significant. In the ordination, *D. ochrophaeus*, *Desmognathus* hybrids and *P. cinereus* were grouped together and positively correlated with organic matter. *G. porphyriticus* was also associated with these species, occupied similar habitats to those of *P. cinereus*, and was positively correlated with bedrock as found in the previous month (Figure 2.2c). *D. fuscus* had an ecological niche closer to *D. ochrophaeus* and was strongly correlated with deep water. *E. bislineata* occupied an ecological niche distinct from all the other species. It was associated with shallower streams, and negatively correlated with organic matter.

In August, *D. ochrophaeus*, *Desmognathus* hybrids, *P. cinereus* and *G. porphyriticus* shared a similar habitat that was positively correlated with organic matter and negatively correlated with water temperature, stream width and soil pH (Figure 2.2d). These three species were fairly orthogonal to *D. fuscus*, a species that seemed to be associated with denser shrub canopy and higher air humidity. *E. bislineata* alone occupied sites with higher soil pH and larger, warmer streams.

In September (Figure 2.2e), the species positions were similar to those of previous months. The exception was *P. cinereus* which was neither positioned with *D. ochrophaeus* nor *Desmognathus* hybrids. The abundance of this species was positively correlated with soil humidity and was negatively affected by high soil pH. Both *D. ochrophaeus* and *Desmognathus* hybrids were found to be orthogonal to *D. fuscus* and were associated with deeper streams, organic matter and rainfall. While the habitats of *G. porphyriticus* and *E. bislineata* were characterized by warmer streams with a moderate stream flow, that of *D. fuscus* was associated with slower stream flow and higher soil pH.

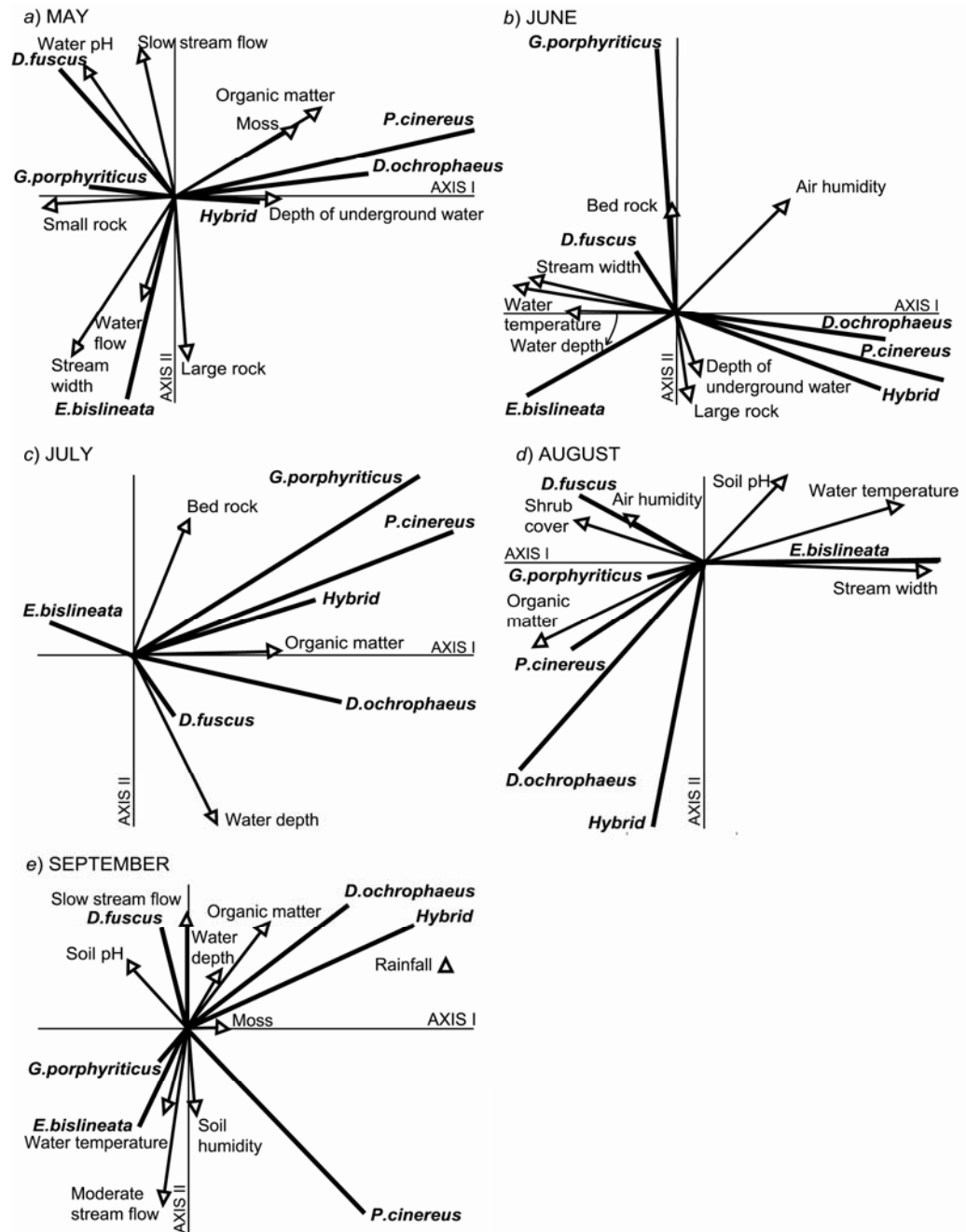


Figure 2.2. CCA ordination of the species abundances constrained by the environmental variables selected for each of the five months studied. Projection of the species (lines), of the quantitative or semi-quantitative (arrows) and binary (Δ) environmental variables. The two first canonical axes explain respectively a) 78.9%, b) 69.7%, c) 90.3%, d) 83.2% and e) 78.4% of the inertia in the species abundance data. Variables are all significant at the $\alpha = 0.05$ level.

2.5.2.3. *Mantel tests*

All Mantel tests among similarity matrices computed from species abundance data revealed significant correlations between months. Thus the tests showed that the quantitative community composition structure was largely conserved across the months. The partial Mantel tests performed on the same matrices while controlling for the effect of geographical distances provided the same results, indicating that the results were not affected by spatial proximity.

Some of the Mantel tests among similarity matrices computed from species presence-absence data were not significant: May was uncorrelated to July, whereas September was uncorrelated to all the other months. The principal coordinate ordination based on the Mantel statistics illustrates these differences graphically (Figure 2.3). Here again, partial Mantel tests were concordant with the results of the simple Mantel tests.

All Mantel tests comparing the similarity matrices computed from environmental variables were significant and exhibited homogeneity among the sites across the five months. All partial tests were also significant. Hence, environmental conditions do not differ among months.

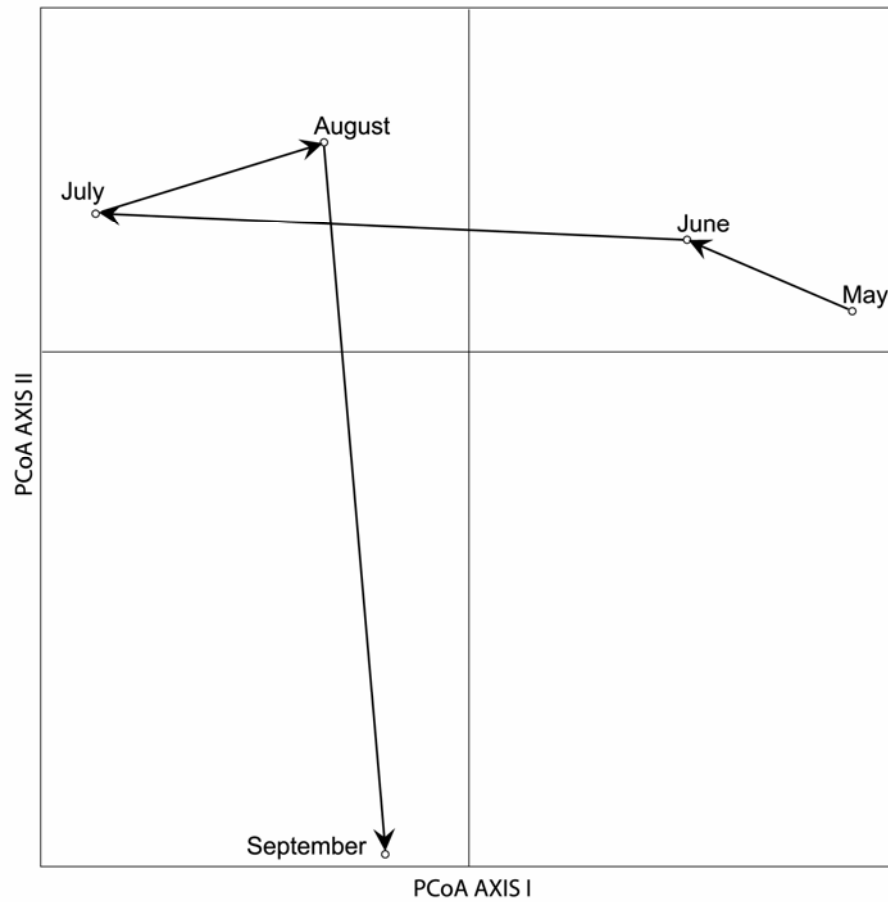


Figure 2.3. Among-month variability illustrated in the space of the first two principal coordinates, obtained from analysing a matrix of the Mantel statistics comparing presence-absence data (coefficient proposed by Sokal & Sneath 1963). The first two principal coordinates (PCoA axes I and II) explained 30.1% and 27.3% of the total variation, respectively.

2.6. DISCUSSION

The assemblage of streamside and terrestrial salamanders along a moisture gradient has been widely studied (reviewed by Hairston 1987, Grover 2000, Grover & Wilbur 2002, Petranka & Smith 2005). Indeed, it has been shown that plethodontid salamanders can be found along a continuum of aquatic to terrestrial habitats (reviewed by Hairston, 1987). At one end of this habitat moisture gradient is *G. porphyriticus*, an entirely aquatic species with an extended aquatic larval stage (3 years or more; Desroches & Rodrigue 2004). On the other extreme of the gradient is *P. cinereus*, truly terrestrial with no aquatic stage (Petranka 1998). *Desmognathus* species are essentially semiaquatic streamside salamanders with shorter aquatic larval stage (between 2 weeks and 10 months; Petranka 1998, Desroches & Rodrigue 2004). *E. bislineata* is a generalist stream species that can be occasionally found in the forest, far away from streams (Petranka 1998, Desroches & Rodrigue 2004, Grant *et al.* 2005).

Along the moisture gradient, it is mainly competition and predation that regulate the species distribution (reviewed by Hairston 1987, Beachy 1993, 1997, Grover & Wilbur 2002). Consequently, there is typically very little overlap in the spatial distribution of streamside and terrestrial salamanders (Grover, 2000). In general, aquatic species can influence the spatial distribution of the more terrestrial species, forcing them to move into drier terrestrial habitats and modifying their activity patterns (Hairston 1949, Smith & Pough 1994). This has been observed within the *Desmognathus* genus, where large aquatic taxa are known to displace smaller taxa to more terrestrial, less optimal sites (Organ 1961, Hairston 1980, 1986, Keen 1982).

Our findings concur that the ordination of species in Covey Hill are distributed along a gradient from aquatic to terrestrial habitats with *E. bislineata* then *G. porphyriticus* at one end, the *Desmognathus* genus (including hybrids) in the middle, and *P. cinereus* at the other end of the spectrum. The position of *E. bislineata* is broader than the others, as the

species is usually found in streams, but can venture far into forested habitats (Petranka 1998, Desroches & Rodrigue 2004). In general, the salamander distribution and abundances among sites vary with month, following seasonal patterns (Organ 1961, Martof & Rose 1963, Moore *et al.* 2001).

Interestingly, the Mantel tests based upon presence/absence data revealed differences among sites in September, while no differences were detected when analyzing species abundances. Effectively, this reveals that sites become colonized by species that were absent in earlier months, while other species disappear from sites that they formerly inhabited. The differences observed in September may be explained by the species breeding, as 62 salamander nests were observed from early to mid September at Covey Hill. Competitive release and reduced territoriality among salamanders during reproduction have been previously reported. At that time species are more abundant locally and occasionally co-exist in the same retreats (Petranka 1998). September also differed from other months in terms of rainfall and temperature. These factors may have affected the environmental conditions, converting drier sites into wetter habitats, and thus causing migration toward previously uninhabited sites. Indeed, rain has been shown to promote better foraging conditions for salamanders, improving their mobility, decreasing their water loss (Jaeger 1972, Fraser 1976), and increasing their predation success through a greater abundance of soil vertebrates.

2.6.1. *Plethodon cinereus*

In the CCA biplots, the abundance of *P. cinereus* was either negatively correlated or orthogonal to the variables associated with aquatic habitats (stream width, water depth, stream flow, water flow). This species can tolerate as well as recover from higher dehydration (Grover 2000), and is the most terrestrial species in the Covey Hill salamander community. In our study, the species is found in the most terrestrial sites where the underground water is deeper (May and June). Furthermore, *P. cinereus* avoids

G. porphyriticus and is strongly displaced by *D. fuscus* (Grover & Wilbur 2002). Consequently, it occupies an ecological niche that is almost orthogonal to *D. fuscus* during all the monthly surveys, and is apart from *G. porphyriticus* in May, June and September. In July, the association of *P. cinereus* with *G. porphyriticus* is significant only on the first ordination axis, while in August, the correlation between the two species is fairly poor.

The substrate preference of *P. cinereus* was suggested to be based on the moisture content or moisture-holding capacity of the substrate rather than its texture. It has been demonstrated that *P. cinereus* suffers from greater body water loss and higher mortality rates when found in a rock substrate versus a soil substrate (Jaeger 1971a). In our results, *P. cinereus* is positively correlated with soil humidity (September) and organic matter (May, July and August) and strongly negatively correlated with small rock (May). Similar results were found by Herrington and Larsen (1985) for another species in the same genus. Soil humidity can also affect the species abundances by offering more optimal foraging conditions (Petranka 1998, Grover 2000). Accordingly, moisture conditions have been suggested to be the most critical factors in the ecology of lungless salamanders (Spotila 1972).

Air humidity was also slightly correlated with the abundance of *P. cinereus* (June, August). This component is known to play a significant role in the water economy of this species and hence its distribution, since it is very sensitive to evaporation induced by dry air (Shelford 1913, Heatwole & Lim 1961, Heatwole 1962). Substrates that consist of larger rocks retain moisture better and longer than those comprising smaller rocks. As well, large-rock substrates provide habitat for a larger quantity of invertebrates that can be consumed by salamanders in their retreats (Jaeger *et al.*, 1995).

Moss can also retain significant amounts of moisture at a site. Plant cover indirectly affects salamander distribution by increasing the microhabitat's relative humidity (Heatwole

1962). These two elements are positively associated with the abundances of *P. cinereus* (May and June).

Finally, *P. cinereus* is strongly and negatively affected by high soil pH values (August and September). Previous work by Wyman & Hawksley-Lescault (1987), showed the influence of low pH values on the distribution and survival of the species, while earlier studies demonstrated this species' preference of near neutral soils. In our case, the species distribution may likewise be limited by the availability of soil with suitable pH (Wyman & Hawksley-Lescault 1987). This effect of soil pH may be further reinforced by the involvement of many competitors.

2.6.2. *Eurycea bislineata*

In a different study, *E. cirrigera* has been shown to exploit habitats that are intermediate to those of *P. cinereus* and *D. fuscus*, filling the gaps unoccupied by both species along the aquatic to terrestrial gradient (Pasachnik & Ruthig 2004). This may also be the case for *E. bislineata* that occupies a position that is distinct from the other species during nearly the entire survey. The sole exception occurs in September, when it is associated with *G. porphyriticus*, the most aquatic salamander in Covey Hill.

Despite its intermediate tendencies, *E. bislineata* demonstrated associations with a more aquatic environment. The abundance of the species is strongly associated with larger streams (May, June and August) that have continuous water flow (May) or a moderate stream flow (September). The species seems to tolerate higher soil pH values (August), and higher water temperatures (June, August and September). Barr & Babbitt (2002) found a negative effect of low pH streams on the species. Grant *et al.* (2005) hypothesized that streams with higher pH would furnish habitat for more species at higher abundances than those with lower pH values. The species position in the ordination is also positively correlated with the presence of large rocks (May and June) and negatively correlated with

thinner substrates, such as organic matter (May, July, August and September). As *Desmognathus* hybrids, *D. ochrophaeus* and *P. cinereus* often prefer organic matter, while *G. porphyriticus* is found associated with the bed rock or small rocks, *E. bislineata* may select cover items not used by the other competitors, especially as it is known to be a ubiquitous species (Grant *et al.* 2005).

2.6.3. *Gyrinophylus porphyriticus*

Even though *G. porphyriticus* is the most aquatic species of the salamander community of Covey Hill, the species is not correlated with the environmental variables that describe best aquatic habitats. It is rather *E. bislineata* that inhabits the larger streams of Covey Hill. Both species are found together in September when they are associated with moderate stream flow. *G. porphyriticus* can successfully displace other salamander species towards drier habitats and thus benefit from habitats with optimal moisture (Hairston 1949, Grover & Wilbur 2002). The aquatic plethodontid salamanders may use the aquatic habitat for respiration and hydration but may also spend time foraging in terrestrial habitats (Pasachnik & Ruthig 2004).

This large species is known to prey upon smaller salamanders such as *D. ochrophaeus*, *D. fuscus* (Tilley 1973b), *E. bislineata* (Bruce 1979) and possibly *P. cinereus* (Grover & Wilbur 2002). Our results show an association of *G. porphyriticus* with *D. fuscus* in earlier months (May and June). Later on in the season, this species is associated with the more terrestrial species *P. cinereus* (July and August, although only the first axis is significant in July). It is possible that the niche overlap with *G. porphyriticus* is reduced, as *D. fuscus* usually occupies streamside habitats and is able to persist in temporary seeps where the aquatic predator is absent (Grover & Wilbur 2002). Also, *P. cinereus* may avoid both *D. fuscus* and *G. porphyriticus* by using dryer habitats as the former species has a higher tolerance to desiccation (Grover 2000, Grover & Wilbur 2002).

Other than unfavorable environmental conditions, the main threat to the large aquatic *G. porphyriticus* is probably higher-trophic predators such as fish (Resetarits 1991, 1995). *G. porphyriticus* has been shown to move towards the drier end of the moisture gradient to avoid such pressures (Rissler *et al.* 2004). This could explain its association with *D. fuscus* or *P. cinereus*. Even when found in sympatry with the more terrestrial species, *G. porphyriticus* is always associated with streams where the underground water is close to the surface (May and June) or where soil humidity is high (September). The species abundance is positively correlated with small rocks (May) or bed rock (June and July) and either positively or negatively correlated with organic matter. The latter substrate has a good moisture-holding capacity, and this may be crucial for this strictly aquatic species when moisture conditions are low. Finally, water pH has a positive effect on the abundance of *G. porphyriticus* (May) while soil pH has a negative effect on the species in August. Grant *et al.* (2005) failed to relate this parameter to the presence of the species.

2.6.4. *Desmognathus fuscus* and *Desmognathus ochrophaeus*

D. fuscus and *D. ochrophaeus* are known to have distinct ecological niches, spatially isolated but not completely discrete with some degree of overlap in micro-habitat (Martof & Rose 1963, Krzysik 1979). The two *Desmognathus* species found at Covey Hill segregate along a moisture gradient, as formerly proposed by several authors the smaller *D. ochrophaeus* being more terrestrial than *D. fuscus* (Hairston 1949, Organ 1961, Shealy 1975). *D. fuscus* prefers wetter substrates and is usually found closer to open water. *D. ochrophaeus* is located at a greater distance from open water on dryer substrates (Hairston 1949, Spotila 1972, Krzysik 1979, Tilley 1997, Petranka & Smith 2005).

Our results show that *D. ochrophaeus* is always positioned in opposite to the hydrological variables, showing negative correlations with stream width (May, June and August), continuous water flow (May) and moderate stream flow (September). *D. ochrophaeus* is found in drier habitats where the underground water is deeper (May and June), whereas

D. fuscus is associated with streams having a slow stream flow (May and September). It is known that *D. fuscus* recovers from dehydration much more slowly than the terrestrial *P. cinereus* or than *D. ochrophaeus*. This later species has the largest ecological tolerance among the members of the genus (Tilley 1970, Grover 2000). Moreover, *D. ochrophaeus* is associated with the terrestrial *P. cinereus*, (May, June, July and August) while *D. fuscus* is more frequently associated with the aquatic *G. porphyriticus* (May, June, August).

Species segregation may be enforced by the capacity of *D. fuscus* to displace *P. cinereus* and *D. ochrophaeus* towards drier habitats (Krysiak 1979, Grover & Wilbur 2002) and of *E. bislineata* to use a wide range of habitats (Grant *et al.* 2005). Perhaps, *D. ochrophaeus* may not be able to fully exclude *P. cinereus* from its habitat. Petranka & Smith (2005) encountered *Desmognathus* and *Plethodon* broadly overlapping, and suggested that *Desmognathus* were ineffective in excluding *Plethodon* from moist habitats.

The predation pressure of *G. porphyriticus* on *D. ochrophaeus* could also explain ecological niche segregation during the survey period (Tilley 1973b, Uzendoski *et al.* 1993, Hileman & Brodie 1994). *D. fuscus* does not follow this pattern and shares similar habitats with *G. porphyriticus* throughout the surveyed months, even if the predation pressure is relevant (Forester 1979, Petranka 1998). *D. fuscus* can probably limit the niche overlap by adjusting its periods of activity, by using different refuges or by modifying its feeding behavior (Jaeger 1971b, Fraser 1976, Krzysik 1979, Roudebush & Taylor 1987, Grover 2000). In nature, *D. fuscus* was reported to remain in temporary seeps, retreating to terrestrial refuges during dry periods with low rainfall. This behavior could be in anticipation of avoiding predation by large stream salamanders (Grover 2000, Grover & Wilbur 2002).

D. fuscus is usually found with substrates of intermediate coarseness such as medium, coarse gravel or small rocks, while *D. ochrophaeus* prefers finer substrates like humus, silt

or silt-gravel mixtures (Krzysik 1979). In sympatry, both species overlap to a great extent in moisture and substrate preferences. Our results show that abundances of *D. ochrophaeus* are positively correlated with organic matter (May, July, August and September), always orthogonal with both bedrock and large rocks (May, June and July), as well as negatively correlated with small rocks (May). Our analyses did not reveal a clear substrate preference for *D. fuscus*.

Low pH values are known to be the most critical on survival during the early stages of stream salamanders (Kucken *et al.* 1994). Values below 4.0 may depress plethodontid salamander populations (Wyman & Hawksley-Lescault 1987, Wyman 1988, Wyman & Jancola 1992). Petranka & Smith (2005) observed the highest densities of terrestrial-breeders at these pH levels, and suggested that some populations may tolerate these conditions. In our study, soil acidity was negatively associated with *D. ochrophaeus* (August), however higher soil and water acidity was positively associated with *D. fuscus* (May and September).

Finally, the abundance of *D. fuscus* is found to be strongly positively associated with a denser shrub cover (August). This result agrees with Young & Yahner (2003) who detected a positive correlation between the number of shrubs and mean numbers of salamanders. To a lesser extent, moss cover was also significantly correlated with abundances of *D. ochrophaeus* (May and September). This agrees with the suggestion that low-lying vegetation is important to several woodland amphibians (Rodewald & Yahner 1999). Salamanders are not directly influenced by the presence of plants but benefit indirectly through the high-moisture and low-temperatures micro-habitats that plants can generate (Heatwole 1962).

2.6.5. *Desmognathus* hybrids

Our results suggest that hybrids use habitats that are more similar to those of the two most terrestrial species within the community: *P. cinereus* and *D. ochrophaeus*. Hybrid abundances were strongly correlated with deeper underground water (May and June) and organic matter (May, July, August and September). Hybrids are negatively associated with high soil pH (August) as observed for *D. ochrophaeus*. Moss and rainfall seem to be positively correlated with the abundance of hybrids in September. Surprisingly, this ecological niche of hybrids consistently overlaps with that of *D. ochrophaeus*. The two species are typically associated with *P. cinereus*, except in September. This observation could be explained by hybrids having a similar fitness to *D. ochrophaeus* as backcrosses between hybrids and *D. ochrophaeus* were previously suggested (Karlin & Guttman 1981, Sharbel *et al.* 1995). Furthermore, *D. ochrophaeus* × *D. fuscus* hybrids are often more closely related to *D. ochrophaeus* (Sharbel *et al.* 1995).

Female *D. ochrophaeus* are known to be philopatric and return to the same stream segments to lay their eggs (Forester 1977). As females of this species tend to reproduce in the same habitat generation after generation, Forester (1979) proposed that proximally nesting females would be more closely related. Sharbel *et al.* (1995), observed that hybridization between *Desmognathus* is unidirectional in Québec, with *D. ochrophaeus* being the mother species. Therefore hybrids observed at a site are probably closely related to female *D. ochrophaeus* of the surrounding habitat. Our results would support this idea, revealing that hybrids share same habitats than the mother species, not only during the reproduction period in September, but all season long.

Our results thus raise important questions about the competitiveness of hybrids. Although hybridization is a common phenomenon among amphibians (Arntzen & Wallis 1991, Green 1996, Werner & Watson 1996), few studies have measured hybrid fitness in salamanders

with respect to the parental species. Larval leopard frog hybrids (*Rana blairi* × *R. sphenoccephala*) were shown to be at least as successful as the pure parental species due to environment-dependent selection (Parris 2001). Similarly, hybrid populations of fire-bellied toads (*Bombina bombina* × *B. variegata*) and Spadefoot toads (*Spea multiplicata* × *S. bombifrons*) are known to inhabit ephemeral pools (Pfennig 2003, Vines *et al.* 2003) in which hybrid offspring seem to outperform the parental species (Pfennig 2003). It may be that the *Desmognathus* hybrids can displace the parental species *D. fuscus*, resulting in their orthogonal position during the season. The genetic similarity of the hybrids with *D. ochrophaeus*, potentially augmented through occasional backcrossing in regions of sympatry, could explain their similar habitat use. This hypothesis warrants further investigation, and future genetic analyses may provide more precise results than those obtained on morphological grounds.

2.7. ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Claude Daigle and Lyne Bouthillier from the Ministère des ressources naturelles de la faune et des parcs du Québec (MRNFP), Alexandra Rutherford, Yannick Côté, Geneviève Leroux and Réjean Boutin for their help in the fieldwork. Thanks to Pedro Peres-Neto for calculating the adjusted R^2 values for all CCA analyses. Thanks also to Pierre Legendre, Jacques Brisson from the Université de Montréal and the members of the Laboratoire d'Écologie Moléculaire Et Évolution (LEMEE) for their support and earlier comments on this manuscript. This work was supported by funding from Environnement Canada, Fondation de la Faune du Québec, and by NSERC grant # OGP0155251 to F.-J. Lapointe.

CHAPITRE 3:
MORPHOLOGICAL CHARACTERS MAY BE RELIABLE TO
IDENTIFY *DESMOGNATHUS OCHROPHAEUS* AND
D. FUSCUS, BUT NOT ALWAYS WITH HYBRIDS

Cet article sera soumis prochainement:

Boutin, A. & F.-J. Lapointe. 2006. Morphological characters may be reliable to identify *Desmognathus ochrophaeus* and *D. fuscus*, but not always with hybrids.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Anaïs Boutin,

2-335-1-0 M.Sc. en Sciences Biologiques

2. Description de l'article

Cet article sera soumis prochainement :

Boutin, A. & F.-J. Lapointe. 2006. Morphological characters may be reliable to identify *Desmognathus ochrophaeus* and *D. fuscus*, but not always with hybrids.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Anaïs Boutin inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation de l'habitat d'une communauté de salamandres de ruisseaux comportant des hybrides».

François-Joseph Lapointe

Coauteur

Signature

Date

3.1. RÉSUMÉ

Les salamandres *Desmognathus* présentent d'importantes variations morphologiques et de nombreuses espèces du genre peuvent s'hybrider. Conséquemment, l'identification des espèces à partir de caractères morphologiques externes peut être particulièrement difficile, spécialement pour les hybrides. Dans cet article, nous évaluons l'utilité de deux éléments du patron dorsal pour discriminer *D. ochrophaeus* de *D. fuscus* aussi bien que les hybrides. Pour ce faire, nous proposons une nouvelle approche moléculaire utilisant l'ADN mitochondrial (région 12S) et nucléaire (région RAG-1) pour identifier les deux espèces et déterminer le sens de l'hybridation. Sur la base de l'identification moléculaire, nos résultats montrent que les caractères morphologiques sont adéquats pour discriminer les espèces parentales, mais l'utilisation d'un seul marqueur nucléaire semble problématique pour identifier les hybrides qui ne sont pas de la F1, étant donné que la majorité des rétrocroisements sont unidirectionnels.

3.2. ABSTRACT

Desmognathine salamanders show remarkable morphological variation and many species among the genus can hybridize. Hence, species assignment using external morphological characters may be particularly challenging, especially for morphologically intermediate hybrids. In this paper, we evaluate the usefulness of two dorsal pattern elements to discriminate *D. ochrophaeus* from *D. fuscus*, as well as possibly identify hybrids. To do so, we propose a new molecular approach using mitochondrial (12S region) and nuclear (RAG-1 region) DNA to identify the two species and determine the direction of hybridization. On the basis of molecular identification, our results show that morphological characters provide accurate discrimination of the parental species, but the use of a single nuclear marker appears problematic to identify hybrids that are not F1, especially since most of the backcrosses are unidirectional.

3.3. INTRODUCTION

The morphological variability among species of the *Desmognathus* genus has been widely discussed (Martof & Rose 1963, Huheey 1966, Tilley 1969, Anderson & Tilley 2003), and it generated numerous taxonomical challenges, such as the identification of many subspecies with increasing numbers of synonyms. For example, 25 synonyms exist for the species *D. fuscus* (Frost 2004). Perhaps the largest morphological variability is found within the *D. ochrophaeus* complex, actually composed of six morphologically similar species, which are known to interbreed: *D. apalachicola*, *D. carolinensis*, *D. ocoee*, *D. orestes*, *D. imitator*, and *D. ochrophaeus* (Tilley & Mahoney 1996). The *D. fuscus* complex has also been described; it includes the interbreeding species *D. fuscus* and *D. santeetlah* (Tilley 1981, 1988, Petranka & Smith 2005). Sexual isolation and speciation among plethodontid salamanders have been studied at large (reviewed by Arnold *et al.* 1993). Significant reproductive isolation has been observed within the *D. ochrophaeus* and *D. fuscus* species, among geographically distant populations (Karlin & Guttman 1981, 1986, Tilley & Schwerdtfeger 1981, Houck *et al.* 1988, Verrell 1990*a*, 1990*b*). Yet, much of the species relationships in the *Desmognathus* genus remain unresolved (Tilley & Mahoney 1996, Titus & Larson 1996, Anderson & Tilley 2003).

Although the Allegheny mountain dusky salamander (*D. ochrophaeus*) and the Northern dusky salamander (*D. fuscus*) are not sister species and are distant on a genetic basis, taxonomists have repeatedly brought up the idea that they could hybridize. This assumption was first based on morphological similarities (Dunn 1926, King 1939, Martof & Rose 1963), and further validated by protein electrophoresis analyses (Karlin & Guttman 1981, Sharbel & Bonin 1992, Sharbel *et al.* 1995). Hybridization has been detected in several populations, in Ohio, Pennsylvania, and also in Québec, but this remains a rare phenomenon (Karlin & Guttman 1981, Houck *et al.* 1988, Sharbel *et al.* 1995).

The important inter- and intrapopulation variation combined with possible hybridization make species assignment using external morphological characters particularly challenging. In spite of these ambiguities, morphological identification of the species is common in salamander ecology and is widely used in Québec. With the actual concerns about the survival of *D. ochrophaeus* in Canada, listed as an endangered species by the COSEWIC (2001), a recovery plan is underway to protect the species habitats and sustain the Québec population. The actual distribution of the species is mainly based on morphological identification. Also, since hybrids are found throughout the distribution of *D. ochrophaeus* and both taxa may be quite similar, an adequate discrimination of the parental species is of great importance. Further conservation issues have to assume that the observations made on a morphological basis are accurate and reliable. If not, other identification methods need to be developed.

At least five dorsal patterns are recognized for *D. ochrophaeus*, on the basis of the characteristics of the dorsolateral stripes, the dorsal pattern or the melanic rates (Martof & Rose 1963, Tilley 1969, Anderson & Tilley 2003). Typical patterns have been identified for *D. ochrophaeus* and *D. fuscus* species (Tilley 1969), but they change along the species distribution from south to north (Conant & Collins 1998, Tilley 1969). Two morphological characters inspired by those proposed by Tilley (1969) and Conant & Collins (1998) may be used to identify the dusky salamanders of Québec and their hybrids. The first is based on the shape of the dorsolateral stripes and the second refers to the disposition of the elements from the dorsal pattern. Typically, *D. ochrophaeus* has straight dorsolateral stripes (Tilley 1969, Conant & Collin 1998) and a dorsal band composed of a central row of spots more or less in a chevron-like shape (Tilley 1969). For *D. fuscus*, the dorsolateral stripes are irregular, sinuous or in a zigzag shape and the dorsal band exhibit numerous spots unevenly disposed in a non linear structure (Conant & Collins 1998). Following these characteristics, a specimen identified as an hybrid shares one distinct character of each species (*i.e.* straight dorsolateral stripes and a dorsal band with spots distributed without a linear structure or

sinuous dorsolateral stripes and a dorsal band showing spots distributed in a unique central line).

In this paper, we wanted to evaluate the performance of these two morphological characters to discriminate *D. ochrophaeus* and *D. fuscus*, and further identify their hybrids. To do so, we propose a new molecular approach using nuclear and mitochondrial DNA to possibly identify both species and hybrids unambiguously.

3.4. MATERIALS AND METHODS

3.4.1. Salamander sampling

The salamander survey was conducted in the Covey Hill region of Québec (Canada) where *D. ochrophaeus* and *D. fuscus* are often found in sympatry and hybridization is known to occur. This area represents one of the few localities where *D. ochrophaeus* is encountered in Canada. It represents the northernmost limit of the distribution of that species in North America. Between May and September 2004, we captured specimens of both species and their hybrids, from multiple sampling sites distributed close to the border between Canada and the USA. Each individual was identified using morphological characters; tissue samples were also collected for molecular identification.

3.4.2. Morphological identification

In the present study, the dusky salamanders were identified to the corresponding species using morphological characters based on two distinct characteristics of the dorsal patterns: the dorsolateral stripes and the dorsal band.

Specimens identified as *D. ochrophaeus* correspond to the recognized northern morphological type described by Conant & Collins (1998). These specimens were

characterized by the presence of a straight or nearly straight dorsolateral stripe, corresponding to the “*regular band*” or “*ochrophaeus*” pattern of Martof & Rose (1963), or the “*A*” and “*B*” patterns of Tilley (1969). Similarly, the typical dorsal pattern suggested by Tilley (1969) for northern *D. ochrophaeus* specimens is characterized by a single row of mid-dorsal spots (Figure 3.1a). Thus, we also identified *D. ochrophaeus* according to this pattern, including cases for which the spots were replaced by chevrons or any other pattern distributed in a single central row (see Conant & Collins 1998, Desroches & Rodrigue 2004).

On the other hand, *D. fuscus* specimens had dorsolateral stripes that were clearly not straight, often with a zigzag or wavy shape, resembling some of the morphotypes fixed in the southern populations of *D. ochrophaeus*, such as the “*C*” or “*D*” patterns of Tilley (1969) (Figure 3.1b). *D. fuscus* specimens were also recognized by the lack of a linear structure in the organization of the dorsal spots; the spots were distributed randomly along the dorsal band (Conant & Collins 1998, Desroches & Rodrigue 2004).

We attributed the status of morphological hybrids to all specimens that shared characters from either one of the parental species, that is, either a zigzag dorsolateral stripe with a single row of mid-dorsal spots, or a straight dorsolateral stripe with randomly distributed dorsal spots.

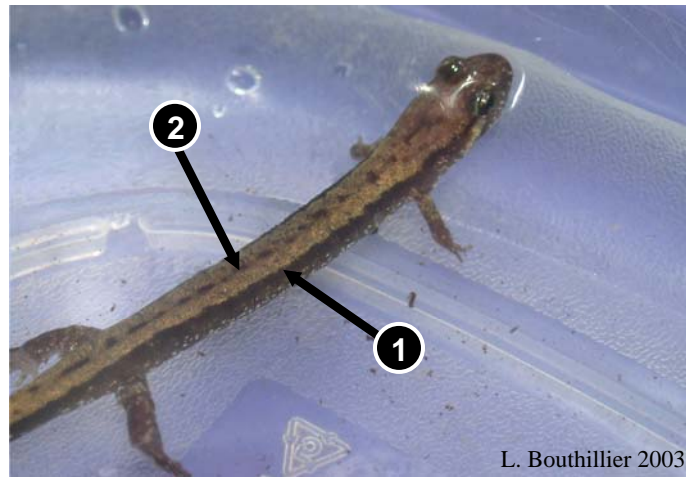
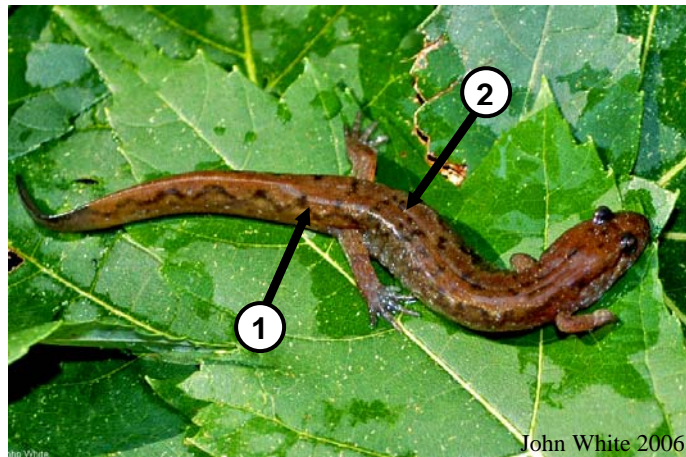
a)*b)*

Figure 3.1. Morphological identification of a) *Desmognathus ochrophaeus* and b) *Desmognathus fuscus* based on the shape of the dorsolateral stripes (1) and characteristics of the dorsal band (2).

3.4.3. Molecular identification

Genomic DNA was extracted from 2 mm tail clips preserved in 90 % ethanol, using a standard phenol-chloroform protocol (Sambrook *et al.* 1989) and *Super Tubes Phase Lock Gel* (Eppendorf). A total of 31 specimens, (10 *D. fuscus*, 11 *D. ochrophaeus* and 10 morphological hybrids) were used for sequence analysis of the 12S mtDNA region, RAG-1 nuclear DNA region and restriction enzymes, while an additional 39 morphological hybrids were analyzed only with restriction enzymes. For these hybrids, DNA was extracted using the *Quick Lysis* method (Olsen *et al.* 1996).

3.4.3.1. Mitochondrial DNA (12S region)

Primers B and G from Titus & Larson (1996) were used to amplify a 500 bp fragment of the 12S ribosomal DNA. Amplifications were carried out in 25 µl volumes, including 4 µl of 10× reaction buffer, 0.2 mM of each dNTP, 0.16 µM of each primer, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase and 2 µl of resuspended genomic DNA. PCR profile was slightly modified from Titus & Larson (1996), with a denaturation phase of 30 sec at 94 °C, 35 sec at 55 °C, and 150 sec at 70 °C, performed for 30 cycles. PCR products were visualized on a 3 % agarose gel using *Vistra Green Nucleic Acid Stain* (Amersham Biosciences), and purified with the *Qiaquick purification kit* (Qiagen), prior to being cycle-sequenced in both directions on an ABI automated sequencer (Applied Biosystems). Our results were compared to published sequences in *GenBank* using a *Blast* search to determine the identity of the specimens.

3.4.3.2. Nuclear DNA (RAG-1 region)

A 500 pb segment of the RAG-1 nuclear gene was amplified using primers that we designed, based on published sequences of other *Desmognathus* species (Chippindale *et al.* 2004): forward primer 5'-CACAAGCTTCTCATCATAGCC-3'; reverse primer 5'-TTCCAGCCTTTACATGC-3'. PCR amplifications were carried out in 25 µl volumes including 2.5 µl of 10× reaction buffer, 0.2 mM of each dNTP, 0.6 µM of each primer,

0.5 U of *Taq* DNA polymerase and 5 µl of resuspended genomic DNA. The amplification profile followed conditions proposed by Greenhalgh *et al.* (1993): after an initial denaturation at 95 °C for 5 min, cycling was performed for 30 cycles of 60 sec at 95 °C, 60 sec at 50 °C, 120 sec at 72 °C, with a final extension of 10 min at 72 °C. Amplification success was confirmed by running PCR products on a 3 % agarose gel and PCR products were purified and cycle-sequenced, as for the 12S region. Sequences were aligned using *Clustal X* (Thompson *et al.* 1997) and this allowed defining 10 species-specific sites to discriminate between *D. ochrophaeus* and *D. fuscus*, as well confirming the identification provided by mtDNA.

3.4.3.3. Restriction enzyme analysis

The RAG-1 region sequences were analyzed with the *CARTERES* software (Infobiogene) to identify specific restriction enzymes for both species. Two enzymes were selected: *HhaI* which is specific to *D. fuscus* and *HpaII*, specific to *D. ochrophaeus*. The 500 bp amplified fragments from the RAG-1 nuclear region were digested separately by the two enzymes overnight at 37 °C. Digestions were realized in 15 µl volumes containing: 1.5 µl of 10× lysis buffer, 0.2 µl of the enzyme and 8 µl of PCR product. Digested PCR products were run on 3% agarose gels to reveal the specimens identity. With the *HhaI* enzyme, two bands should appear on the gel for *D. fuscus*, whereas only one band should be present for *D. ochrophaeus*. On the other hand, the migration of the digested fragments with the *HpaII* enzyme should provide the opposite pattern. Hybrids are thus identified as exhibiting the specific band pattern of both species using the two enzymes.

3.5. RESULTS

The morphological characters that were used to identify the two parental species appear to be accurate since they allowed identifying correctly all specimens, except for one (Table 3-I). This single error was made for a dubious individual that was noted to be very pale, with no clear dorsal patterns, and which turned out to be a hybrid. The identifications obtained

with mtDNA were also consistent with those provided by the nuclear DNA for the parental species, but the latter allowed for the identification of hybrids. Similarly, the restriction enzymes corroborated the identification of the RAG-1 region for 30 specimens, and they were further used to analyze 39 individuals identified as hybrids on the basis of morphology. These results showed that the two morphological characters provided a very low success rate (*i.e.* 22 %) to identify hybrids (Table 3-I). Such hybrids appear to be the result of unidirectional hybridization, since they all possessed the mtDNA of *D. ochrophaeus*. Indeed, in most cases, the misidentified hybrids were actually *D. ochrophaeus* specimens, but two cases corresponded to *D. fuscus*.

Table 3-I. Molecular identification of *D. ochrophaeus*, *D. fuscus*, and hybrids, based on a mitochondrial DNA region (12S), a nuclear DNA region (RAG-1) and restrictions enzymes (HpaII and HhaI) to validate the morphological identification.

TOTAL	MORPHOLOGICAL TYPES	Nb	mtDNA	nucDNA	ENZYMES	MOLECULAR IDENTIFICATION
10	<i>D. fuscus</i>	10	D.f.	D.f.	D.f.	<i>D. fuscus</i>
11	<i>D. ochrophaeus</i>	10	D.o.	D.o.	D.o.	<i>D. ochrophaeus</i>
		1	D.o.	D.f.	D.o./D.f.	Hybrid
49	Hybrid	36	D.o.	D.o.	D.o.	<i>D. ochrophaeus</i>
		2	D.f.	D.f.	D.f.	<i>D. fuscus</i>
		2	D.o.	D.o./D.f.	D.o./D.f.	Hybrid
		10	n/a	n/a	D.o./D.f.	Hybrid

3.6. DISCUSSION

Our results clearly show that the morphological characters used to identify *D. ochrophaeus* and *D. fuscus* species are accurate for specimens showing distinctive dorsal patterns, but they appear problematic when it comes to intermediate or different patterns. Interestingly, Martof & Rose (1963) revealed the scarcity of lightly colored specimens among the 4000 *D. ochrophaeus* he observed. We found one ambiguous *D. ochrophaeus* specimen that was very pale; genetic analysis revealed that it was a hybrid.

In previous hybridization studies of *D. ochrophaeus* and *D. fuscus*, the significant lack of F1 hybrids was noted and it suggested that backcross hybrids were the most prevalent (Karlin & Guttman 1981, Sharbel *et al.* 1995). Only the F1 hybrids should exhibit the intermediate dorsal patterns, whereas successive backcrossing will tend to make hybrids look more and more like the parental species. In Québec, earlier allozyme data suggested that multiple backcrossing occurred exclusively with one parental species (Sharbel *et al.* 1995), and this may explain why most of our putative hybrids turned out to be *D. ochrophaeus*. Furthermore, if hybridization is indeed unidirectional, as claimed by Sharbel *et al.* (1995), it is not surprising to observe that the mtDNA of all hybrid specimens is that of *D. ochrophaeus*.

Whereas F1 hybrids should easily be identified, backcross hybrids will exhibit a wide range of dorsal patterns that may prove to be closer to one of the parental species. Molecular identification can be used to assess the identity of F1 hybrids and the direction of hybridization by comparing the results of mtDNA identification, inherited from the mother species, and of nuclear DNA identification, transmitted by both parents. However, when unidirectional hybridization is the rule, as it is the case here, the use of a single marker is also problematic. Indeed, actual backcrossed hybrids can go unnoticed, even for F2 specimens. Thus, the number of hybrids detected with RAG-1 is probably an underestimate of the actual number of backcrossed individuals. It may well be the case that morphology

does a better job at identifying such hybrids. Additional nuclear markers (*e.g.* microsatellites) should be developed to further address this question. For the time being, it is proposed to use morphological characters with caution, and only to rely on clear dorsal patterns to identify parental species with confidence.

3.7. ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Claude Daigle and Lyne Bouthillier from the Ministère des ressources naturelles de la faune et des parcs du Québec (MRNFP), Alexandra Rutherford, Yannick Côté, Geneviève Leroux and Réjean Boutin for their help in the fieldwork. Thanks also to the members of the Laboratoire d'Écologie Moléculaire Et Évolution (LEMEE) for their support and earlier comments on this manuscript. This work was supported by funding from Environnement Canada, Fondation de la Faune du Québec, and by NSERC grant # OGP0155251 to F.-J. Lapointe.

CHAPITRE 4:
CONCLUSION

4.1. CARACTÉRISATION DE L'HABITAT DE LA COMMUNAUTÉ DE SALAMANDRES DE COVEY HILL

Le premier objectif de mes travaux était de déterminer les préférences écologiques des espèces de salamandres associées aux ruisseaux de Covey Hill, particulièrement celles des salamandres sombres et de leurs hybrides. Face au manque d'information sur l'habitat des salamandres sombres au Québec, un inventaire a été réalisé en 2004. Plusieurs variables d'habitat ont été mesurées afin de déterminer lesquelles pouvaient affecter les abondances des différentes espèces. Des analyses multivariées ont permis de voir comment s'organisent les espèces de la communauté par rapport aux variables environnementales, mais également en fonction de la présence des congénères.

À la lumière de mes résultats, nous pouvons conclure que les espèces de la communauté de salamandres de ruisseaux de Covey Hill possèdent des préférences écologiques spécifiques qui peuvent être définies par un ensemble restreint de variables. Certaines espèces sont très souvent retrouvées dans des habitats similaires alors que d'autres possèdent des niches distinctes tout au long de la saison. La majorité des variables mesurées se sont avérées significatives pour expliquer la répartition des espèces dans l'habitat. Cette ségrégation spatiale est attribuable aux exigences physiologiques et aux préférences d'habitat des espèces, mais également à la prédation ou à la compétition interspécifique pour les sites optimaux. Les espèces étudiées semblent se distribuer dans l'habitat en suivant le gradient d'humidité rapporté dans les études de communautés de salamandres.

Par ailleurs, selon l'hypothèse d'un avantage physiologique apporté par l'hybridation, il était possible d'appréhender que les hybrides *Desmognathus* pouvaient utiliser des habitats différents de ceux des espèces parentales. Cette prédiction a été partiellement confirmée car les niches écologiques des hybrides sont toujours distinctes de celles de *D. fuscus*, mais ressemblent fortement à celles de *D. ochrophaeus* tout au long de la saison. La possibilité d'un avantage physiologique permettant d'exploiter des milieux plus extrêmes n'est donc

pas écartée, mais ne peut être confirmée par nos résultats. La présence des hybrides aux mêmes sites que *D. ochrophaeus* spécialement en septembre, au moment de la reproduction à Covey Hill, peut être expliquée par les rétrocroisements possibles entre ces deux taxons. Également, la fidélité aux sites de ponte, de génération à génération, tend à rassembler dans un même habitat des individus génétiquement plus semblables, d'autant plus que *D. ochrophaeus* est une espèce philopatrise. Si ces affirmations sont exactes, la sélection d'habitat par les hybrides va dans le même sens que l'hybridation unidirectionnelle rapportée au Québec.

Finalement, les analyses mensuelles et les tests de Mantel ont révélé que la distribution des salamandres de Covey Hill varie au cours des mois, alors que les espèces présentes dans les sites en septembre diffèrent significativement des autres mois. Cette différence est attribuée à un relâchement des pressions écologiques et aux conditions environnementales favorisant la colonisation de nouveaux sites, probablement en raison de la période de reproduction.

4.2. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES SALAMANDRES SOMBRES ET DES HYBRIDES

Le second objectif de ce projet était de développer une méthode d'identification moléculaire de *D. ochrophaeus*, *D. fuscus* et possiblement leurs hybrides, afin de valider les critères morphologiques couramment utilisés pour l'identification des espèces.

Les analyses combinées de l'ADN mitochondrial, de l'ADN nucléaire ainsi que les enzymes de restriction ont démontré que les caractères morphologiques sont fiables pour les espèces parentales, en les identifiant correctement dans presque tous les cas. Ces caractères sont probablement également efficaces pour les hybrides, mais cela n'a pu être confirmé. En effet, la méthode d'identification moléculaire développée visait à détecter les hybrides de la F1, ceux qui présentent des patrons dorsaux intermédiaires entre les espèces parentales. Toutefois, les hybrides que nous avons détectés étaient tous issus de

rétrocroisements. L'identification de tels hybrides dans les échantillons relève plutôt du hasard, puisque le génome des hybrides est dilué à chaque génération dans le cas d'introgession avec une des espèces parentales. Il est donc certain que la véritable fréquence des hybrides est sous-estimée dans nos échantillons. Par ailleurs, il nous est impossible de déterminer dans quelle mesure les hybrides détectés ressemblent génétiquement aux espèces parentales avec un seul marqueur moléculaire.

L'ADN mitochondrial s'est avéré utile pour déterminer le sens de l'hybridation, qui semble unidirectionnelle pour tous les hybrides étudiés et correspondait à l'identification morphologique des espèces parentales dans tout les cas. Combiné à l'ADN nucléaire, l'identité des espèces a toujours été confirmée, sauf dans un seul cas. Cependant, l'utilisation des enzymes de restriction peut servir à identifier à la fois les espèces parentales ainsi que les hybrides.

4.3. APPLICATION POUR LA CONSERVATION

Ce projet avait comme objectif principal de contribuer à l'avancement des connaissances sur l'habitat de la salamandre sombre des montagnes, un des mandats du plan d'intervention sur les salamandres de ruisseaux du Québec. Cependant, comme la niche écologique de cette espèce est déterminée par les interactions biotiques au sein de la communauté en plus des conditions environnementales, l'analyse a inclus toutes les espèces de salamandres retrouvées à Covey Hill.

Il a été possible de déterminer les exigences écologiques des salamandres sombres du Québec et de leurs hybrides, mais également de trois autres espèces sympatriques, dont deux sont également visées par le plan d'intervention. Ces informations permettront une approche multispécifique lors de la planification des futures actions de conservation envisagées d'ici 2007. En effet, cette étude a permis de dresser un portrait de la communauté de salamandres de Covey Hill et de cibler les habitats essentiels à protéger.

Toutefois, il faut garder en tête que les salamandres se déplacent dans l'habitat au cours de la saison, en fonction des variations des variables environnementales ou de la période de reproduction. Comme chaque espèce possède sa propre niche écologique, il semble que la conservation d'habitats diversifiés suivant un gradient d'humidité est à favoriser afin de satisfaire les exigences écologiques de toutes les espèces concernées.

Les résultats de l'identification moléculaire de *D. ochrophaeus* et de *D. fuscus* indiquent que les caractères morphologiques relatifs aux éléments du patron dorsal peuvent être utilisés de façon fiable pour discriminer les espèces parentales sur le terrain. En ce qui concerne l'identification morphologique des hybrides, sa fiabilité n'a pu être déterminée, même si la méthode moléculaire a permis de détecter quelques hybrides.

Ce projet contribue à l'avancement des connaissances sur l'habitat et l'identification des salamandres sombres au Québec, et permettra de mieux orienter les actions de conservation futures. La protection des habitats assurera le maintien des populations de salamandres sombres, en plus d'être bénéfiques à toutes les autres salamandres associées aux mêmes habitats.

BIBLIOGRAPHIE

- ALVO, R. & J. BONIN. 2003. Rapport sur la situation de la salamandre sombre des montagnes (*Desmognathus ochrophaeus*) au Québec (traduction française). Société de la faune et des parcs du Québec.
- ANDERSON, J. A. & S. G. TILLEY. 2003. Systematics of the *Desmognathus ochrophaeus* complex in the Cumberland Plateau of Tennessee. *Herpetological Monographs* **17**: 75-100.
- ARNOLD, S. J., N. L. REAGAN & P. A. VERRELL. 1993. Reproductive isolation and speciation in plethodontid salamanders. *Herpetologica* **49**: 216-288.
- ARNOLD, S. J., N. L. REAGAN & P. A. VERRELL. 1996. The evolution of asymmetry in sexual isolation: a model and a test case. *Evolution* **50**: 1024-1033.
- ARNTZEN, J. W. & G. P. WALLIS. 1991. Restricted gene flow in a moving hybrid zone of the newts *Trirurus cristatus* and *T. Marmoratus* in western France. *Evolution* **45**: 805-826.
- BARBOUR, R. W., J. W. HARDIN, J. P. SHAFER & M. J. HARVEY. 1969. Home range, movements, and the activity of the dusky salamander, *Desmognathus fuscus*. *Copeia* **1969**: 293-297.
- BARR, G. E. & K. J. BABBITT. 2002. Effects of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of larval two-lined salamanders (*Eurycea bislineata*) across spatial scales. *Oecologia* **133**: 176-185.
- BARTHALAMUS, G. T. & BELLIS E. D. 1969. Homing in the northern dusky salamander, *Desmognathus fuscus* (Rafinesque). *Copeia* **1969**: 148-153.
- BEACHY, C. K. 1993. Guild structure in streamside salamander communities: A test for interactions among larval plethodontid salamanders. *Journal of Herpetology* **27**: 468-470.
- BEACHY, C. K. 1997. Effects of predatory larval *Desmognathus quadramaculatus* on growth, survival, and metamorphosis of larval *Eurycea wilderae*. *Copeia* **1997**: 131-137.

- BISHOP, S. C. 1941. The salamanders of New York. New York State Museum Bulletin **324**: 329-359.
- BISHOP, S. C. & H. P. CHRISP. 1933. The nest and young of the Allegheny salamander *Desmognathus fuscus ochrophaeus* (Cope). *Copeia* **1933**: 194-198.
- BRODIE, E. D., Jr., R. T. NOWAK & W. R. HARVEY. 1979. The effectiveness of antipredator secretions and behavior of selected salamanders against shrews. *Copeia* **1979**: 270-274.
- BROWN, P. S., S. A. HASTINGS & B. E. FRYE. 1977. A comparison of the water-balance responses in five species of plethodontid salamanders. *Physiological Zoology* **50**: 203-214.
- BRUCE, R. C. 1979. Evolution of paedogenesis in salamanders of the genus *Gyrinophilus*. *Evolution* **33**: 998-1000.
- CARR, D. E. & D. H. TAYLOR. 1985. Experimental evaluation of population interactions among three sympatric species of *Desmognathus*. *Journal of Herpetology* **19**: 507-514.
- CASGRAIN, P. & P. LEGENDRE. 2001. The R package for multivariate and spatial analysis. Département de sciences biologiques, Université de Montréal, Québec, Canada, (<http://www.fas.umontreal.ca/BIOL/Casgrain/en/labo/R/v4/telecharger.html>).
- CHIPPINDALE, P. T., R. M. BONETT, A. S. BALDWIN & J. J. WIENS. 2004. Phylogenetic evidence for a major reversal of life-history evolution in plethodontid salamanders. *Evolution* **58**: 2809-2822.
- COLLEY, S. A., W. H. KEEN & R. M. REED. 1989. Effects of adult presence on behavior microhabitat use of juveniles of a *Desmognathine* salamander. *Copeia* **1989**: 1-7.
- CONANT, R. & J. T. COLLINS. 1998. A field guide to reptiles and amphibians of eastern and central North America. Houghton Mifflin Company, Boston.
- CUPP, P. V., Jr. 1994. Salamanders avoid chemical cues from predators. *Animal Behaviour* **48**: 232-235.
- DANSTEDT, R. T., Jr. 1975. Local geographic variation in demographic parameters and body size of *Desmognathus fuscus* (Amphibia: Plethodontidae). *Ecology* **56**: 1054-1067.

- DANSTEDT, R. T., Jr. 1979. A demographic comparison of two populations of the dusky salamander (*Desmognathus fuscus*) in the same physiographic province. *Herpetologica* **35**: 164-168.
- DAVIC, R. D., C. A. DOLLOFF & L. P. ORR. 1987. The relationship between rock density and salamander density in a mountain stream. *Herpetologica* **43**: 357-361.
- DESROCHES, J. F. & D. RODRIGUE. 2004. Amphibiens et reptiles du Québec et des maritimes. Éditions Michel Quintin, Waterloo, Québec.
- DUELLMAN, W. E. 1993. Amphibian Species of the world: Additions and Corrections. University of Kansas Printing Service. Lawrence, KS.
- DUNN, E. R. 1917. The salamanders of the genera *Desmognathus* and *Leurognathus*. *Proceedings of the United States Natural Museum* **53**: 393-433.
- DUNN, E. R. 1926. The salamanders of the family Plethodontidae. Smith College, Northampton, Mass.
- EATON, T. H. 1956. Larvae of some Appalachian plethodontid salamanders. *Herpetologica* **12**: 303-313.
- FEDER, M. E. 1983. Integrating the ecology and physiology of plethodontid salamanders. *Herpetologica* **39**: 291-310.
- FEDER, M. E. & W. W. BURGGREN. 1985. Cutaneous gas exchange in vertebrates: Design, pattern, control, and implications. *Biological Review* **60**: 1-45.
- FEDER, M. E. & P. L. LONDOS. 1984. Hydric constraint upon foraging in a terrestrial salamander, *Desmognathus ochropheus* (Amphibia: Plethodontidae). *Oecologia* **64**: 413-418.
- FITZPATRICK, L. C. 1973. Energy allocation in the Allegheny Mountain salamander, *Desmognathus ochrophaeus*. *Ecological Monographs* **43**: 43-58.
- FORESTER, D. C. 1977. Comments on the female reproductive cycle and philopatry in *Desmognathus ochrophaeus* (Amphibia, Urodela, Plethodontidae). *Journal of herpetology* **11**: 311-316.
- FORESTER, D. C. 1979. The adaptiveness of parental care in *Desmognathus ochrophaeus* (Urodela: Plethodontidae). *Copeia* **1979**: 332-341.

- FORESTER, D. C. 1981. Parental care in the salamander *Desmognathus ochrophaeus*: female activity pattern and trophic behavior. *Journal of Herpetology* **15**: 29-34.
- FORESTER, D. C. 1984. Brooding behavior by the mountain dusky salamander (*Desmognathus ochrophaeus*): Can the female presence reduce clutch desiccation? *Herpetologica* **40**: 105-109.
- FRASER, D. F. 1976. Coexistence of salamanders in the genus *Plethodon*: A variation of the Santa Rosalia theme. *Ecology* **57**: 238-251.
- FROST, D. R. 1985. *Amphibian Species of the World*. Allen Press and the Association of Systematics Collections. Lawrence, KS.
- FROST, D. R. 2004. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 3.0 (22 August, 2004). American Museum of Natural History, New York, USA. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- GATZ, R. N., E. C. JR. CRAWFORD & J. PIPER. 1975. Kinetics of inert gas equilibrium in an exclusively skin-breathing salamander, *Desmognathus fuscus*. *Respiration Physiology* **20**: 33-41.
- GIBBS, J. P. 1998. Distribution of woodland amphibians along a forest fragmentation gradient. *Landscape Ecology* **13**: 263-268.
- GOWER, J. C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**: 325-338.
- GOWER, J. C. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* **27**: 857-871.
- GRANT, E. H. C., R. E. JUNG & K. C. RICE. 2005. Stream salamander species richness and abundance in relation to environmental factors in Shenandoah National Park, Virginia. *American Midland Naturalist* **153**: 348-356.
- GREEN, D. M. 1996. The bounds of species: Hybridization in the *Bufo americanus* group of North American toads. *Israel Journal of Zoology* **42**: 95-109.
- GREENHALGH, P., C. E. M. OLESEN & L. A. STEINER. 1993. Characterization and expression of recombination activating genes (RAG-1 and RAG-2) in *Xenopus laevis*. *Journal of Immunology* **151**: 3100-3110.

- GROVER, M. C. 1998. Influence of cover and moisture on abundances of the terrestrial salamanders *Plethodon cinereus* and *Plethodon glutinosus*. *Journal of Herpetology* **32**: 489-497.
- GROVER, M. C. 2000. Determinants of salamander distribution along moisture gradients. *Copeia* **2000**: 156-168.
- GROVER, M. C. & H. M. WILBUR. 2002. Ecology of ecotones: Interactions between salamanders on a complex environmental gradient. *Ecology* **83**: 2112-2123.
- HAIRSTON, N. G. 1949. The local distribution and ecology of the Plethodontid salamanders of the southern Appalachian. *Ecological Monographs* **19**: 47-73.
- HAIRSTON, N. G. 1980. Species packing in the salamander genus *Desmognathus*: What are the interspecific interactions involved? *American Naturalist* **115**: 354-366.
- HAIRSTON, N. G. 1986. Species packing in the *Desmognathus* salamanders: Experimental demonstration of predation and competition. *American Naturalist* **127**: 266-291.
- HAIRSTON, N. G. 1987. Community ecology and salamander guilds. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- HALL, R. J. 1977. A population analysis of two species of streamside salamanders, Genus *Desmognathus*. *Herpetologica* **33**: 1109-1034.
- HAWKINS, C. P., M. L. MURPHY, N. H. ANDERSON & M. A. WILZBACH. 1983. Density of fish and salamanders in relation to riparian canopy and physical habitat in streams of the northwestern United States. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **40**: 1173-1184.
- HEATWOLE, H. 1962. Environmental factors influencing local distribution and activity of the salamander, *Plethodon cinereus*. *Ecology* **43**: 460-472.
- HEATWOLE, H. & K. LIM. 1961. Relation of substrate moisture to absorptive loss of water by a salamander *Plethodon cinereus*. *Ecology* **42**: 814-819.
- HERRINGTON, R. E & J. H. LARSEN. 1985. Current status, habitat requirements and management of the Larch Mountain Salamander *Plethodon Larselli* Burns. *Biological Conservation* **34**: 169-179.

- HILEMAN, K. S. & E. D. BRODIE, Jr. 1994. Survival strategies of the salamander *Desmognathus ochrophaeus*: Interactions of predator-avoidance and anti-predator mechanisms. *Animal Behaviour* **47**: 1-6.
- HOLOMUZKI, J. R. 1982. Homing behavior of *Desmognathus ochrophaeus* along a stream. *Journal of Herpetology* **16**: 307-309.
- HOM, C. L. 1988. Optimal reproductive allocation in female dusky salamanders: A quantitative test. *American Naturalist* **131**: 71-90.
- HOUCK, L. D., S. J. ARNOLD & A. HICKMAN. 1988. Test for sexual isolation in plethodontid salamanders (genus *Desmognathus*). *Journal of Herpetology* **22**: 186-191.
- HUHEEY, J. E. 1966. Variation in the Blue Ridge mountain dusky salamander in western North Carolina. *The Journal of the Elisha Mitchell Society* **82**: 118-126.
- HUHEEY, J. E. & R. A. BRANDON. 1973. Rock-face populations of the mountain salamander, *Desmognathus ochrophaeus*, in North Carolina. *Ecological Monographs* **43**: 59-77.
- JAEGER, R. G. 1971a. Moisture as a factor influencing the distributions of two species of terrestrial salamanders. *Oecologia* **6**: 191-207.
- JAEGER, R. G. 1971b. Competitive exclusion as a factor influencing the distributions of two species of terrestrial salamanders. *Ecology* **52**: 632-637.
- JAEGER, R. G. 1972. Food as a limited resource in competition between two species of terrestrial salamanders. *Ecology* **53**: 535-546.
- JAEGER, R. G., J. A. WICKNICK, M. R. GRIFFIS & C. D. ANTHONY. 1995. Socioecology of a terrestrial salamander: Juveniles enter adult territories during stressful foraging periods. *Ecology* **76**: 533-543.
- JONES, R. L. 1986. Reproductive biology of *Desmognathus fuscus* and *Desmognathus santeetlah* in the Unicoi Mountains. *Herpetologica* **42**: 323-334.
- JUNG, R.E., S. DROEGE, J. R. SAUER & R. B. LANDY. 2000. Evaluation of terrestrial and streamside salamander monitoring techniques at Shenandoah National Park. *Environmental Monitoring and Assessment* **63**: 65-79.

- JUTERBOCK, J. E. 1986. The nesting behavior of the dusky salamander, *Desmognathus fuscus*. I. Nesting phenology. *Herpetologica* **42**: 457-471.
- JUTERBOCK, J. E. 1987. The nesting behavior of the dusky salamander, *Desmognathus fuscus*. II. Nest site tenacity and disturbance. *Herpetologica* **43**: 361-368.
- JUTERBOCK, J. E. 1990. Variation in larval growth and metamorphosis in the salamander *Desmognathus fuscus*. II. Nest site tenacity and disturbance. *Herpetologica* **46**: 291-303.
- JUTRAS, J. (éditeur) 2003. Plan d'intervention sur les salamandres de ruisseaux du Québec, Direction du développement de la faune, Société de la faune et des parcs du Québec, Québec.
- KARLIN, A. A. & S. I. GUTTMAN. 1981. Hybridization between *Desmognathus fuscus* and *Desmognathus ochrophaeus* (Amphibia: Urodela: Plethodontidae) in northeastern Ohio and northwestern Pennsylvania. *Copeia* **1981**: 371-377.
- KARLIN, A. A. & S. I. GUTTMAN. 1986. Systematics and geographic isozyme variation in the Plethodontid salamander *Desmognathus fuscus* (Rafinesque). *Herpetologica* **42**: 283-301.
- KEEN, W. H. 1982. Habitat selection and interspecific competition in two species of plethodontid salamanders. *Ecology* **63**: 94-102.
- KEEN, W. H. & L. P. ORR. 1980. Reproductive cycle, growth, and maturation of northern female *Desmognathus ochrophaeus*. *Journal of Herpetology* **14**: 7-10.
- KING, W. 1939. A survey of the herpetology of the Great Smoky Mountains National Park. *American Midland Naturalist* **21**: 531-582.
- KRZYSIK, A. J. 1979. Resource allocation, coexistence, and the niche structure of a streambank salamander community. *Ecological Monographs* **49**: 173-194.
- KRZYSIK, A. J. 1980. Microhabitat selection and brooding phenology of *Desmognathus fuscus fuscus* in western Pennsylvania. *Journal of Herpetology* **14**: 291-291.
- KUCKEN, D. J., J. S. DAVIS, J. W. PETRANKA & C. K. SMITH. 1994. Anakeesta stream acidification and metal contamination: Effects on a salamander community. *Journal of Environmental Quality* **23**: 1311-1317.

- LARSON, A. 1984. Neontological inferences of evolutionary pattern and process in the salamander family Plethodontidae. *Evolution Biology* **17**: 119-217.
- LITTLEFORD, R. A., W. F. KELLER & N. E. PHILLIPS. 1947. Studies on the vital limits of water loss in Plethodontid salamanders. *Ecology* **28**: 440-447.
- LOMBARD, R. E. & D. B. WAKE. 1986. Tongue evolution in the lungless salamanders, family Plethodontidae. IV. Phylogeny of the plethodontid salamanders and evolution of feeding dynamics. *Systematic zoology* **35**: 532-551.
- LUTTERSCHMIDT, W. I., G. A. MARVIN & V. H. HUTCHISON. 1994. Alarm response by a plethodontid salamander (*Desmognathus ochrophaeus*): conspecific and heterospecific « Schreckstoff ». *Journal of Chemical Ecology* **20**: 2751-2759.
- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- MARTOF, B. S. & F. L. ROSE. 1963. Geographic variation in southern populations of *Desmognathus ochrophaeus*. *The American Midland Naturalist* **69**: 377-425.
- MEAD, L. S., S. G. TILLEY & L. A. KATZ. 2001. Genetic structure of the Blue Ridge dusky salamander (*Desmognathus orestes*): Inferences from allozymes, mitochondrial DNA, and behavior. *Evolution* **55**: 2287-2302.
- MINTON, S. A. Jr. 1972. Amphibians and reptiles of Indiana. *Indiana Academy of Science Monographs* **3**: 1-346.
- MOORE, A. L., C. E. WILLIAM, T. H. MARTIN & W. J. MORIARITY. 2001. Influence of season, geomorphic surface and cover item on capture, size and weight of *Desmognathus ochrophaeus* and *Plethodon cinereus* in Allegheny Plateau riparian forests. *The American Midland Naturalist* **145**: 39-45.
- MOTYKA, J. 1974. O zadaniach i metodach badan geobotanicznych. Sur les buts et les méthodes des recherches géobotaniques. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska (Lublin, Polonia), Sectio C, Supplementum*.
- MOUNT, R. H. 1975. *The reptiles and amphibians of Alabama*. Auburn Printing, Auburn, Alabama.
- NOBLE, G. K. 1931. *The biology of the Amphibia*. McGraw Hill, New York.

- OLSEN, J. B., J. K. WENBURG & P. BENTZEN. 1996. Semi-automated multilocus genotyping of Pacific salmon (*Oncorhynchus* Spp.) using microsatellites. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5**: 259-272.
- ORGAN, J. A. 1961. Studies of the local distribution, life history, and population dynamics of the salamander genus *Desmognathus* in Virginia. *Ecological Monographs* **31**: 189-220.
- ORR, L. P. 1989. *Desmognathus ochrophaeus* (Cope), Mountain dusky salamander. pp. 181-189, in R. A. Pflingsten & F. L. Downs. *Salamanders of Ohio*. Bulletin of the Ohio Biological Survey **7**(2). College of Biological Sciences, The Ohio State University. Columbus, Ohio.
- ORR, L. P. & W. T. MAPLE. 1978. Competition avoidance mechanisms in salamander larvae of the genus *Desmognathus*. *Copeia* **1978**: 679-685.
- PARRIS, M. J. 2001. High larval performance of leopard frog hybrids: effects of environment-dependant selection. *Ecology* **82**: 3001-3009.
- PASACHNIK, S. & G. R. RUTHIG. 2004. Versatility of habitat use in three sympatric species of Plethodontid salamanders. *Journal of Herpetology* **38**: 434-437.
- PENDLEBURY, G. B. 1973. Distribution of the dusky salamander *Desmognathus fuscus fuscus* (Caudata: Plethodontidae) in Quebec, with special reference to a population from St. Hilaire. *The Canadian Field Naturalist* **87**: 131-136.
- PERES-NETO, P., P. LEGENDRE, S. DRAY & D. BORCARD. 2006. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology*, (in press).
- PETRANKA, J. W. 1998. *Salamanders of the United States and Canada*. Smithsonian Inst. Press, Washington.
- PETRANKA, J. W. & C. K. SMITH. 2005. A functional analysis of streamside habitat use by southern Appalachian salamanders: Implications for riparian forest management. *Forest Ecology and Management* **210**: 443-454.
- PFENNIG, K. S. 2003. A test of alternative hypotheses for the evolution of reproductive isolation between spadefoot toads: Support for the reinforcement hypothesis. *Evolution* **57**: 2842-2851.
- PRESH, W. 1989. Systematics and science: A comment. *Systematic Zoology* **38**: 181-189.

- RALPH, C. L. 1957. A diurnal activity rhythm in *Plethodon cinereus* and its modification by an influence having a lunar frequency. *Biological Bulletin* **113**: 13-20.
- RESETARITS, W. J. Jr. 1991. Interactions among predators in experimental stream communities. *Ecology* **72**: 1782-1793.
- RESETARITS, W. J. Jr. 1995. Comparative asymmetry and coexistence in size-structured populations of brook trout and spring salamanders. *Oikos* **73**: 188-198.
- RICE, W. E. 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution* **43**: 223-225.
- RISSLER, L. J. & D. R. TAYLOR. 2003. The phylogenetics of Desmognathine salamander populations across southern Appalachians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**: 197-211.
- RISSLER, L. J., H. M. WILBUR & D. R. TAYLOR. 2004. The influence of ecology and genetics on behavioral variation in salamander populations across the Eastern Continental Divide. *American Midland Naturalist* **164**: 201-213.
- RODEWALD, A. D. & R. H. YAHNER. 1999. Effects of forest management and landscape composition on woodland salamanders. *Northeast Wildlife* **54**: 45-54.
- ROUDEBUSH, R. E & D. H. TAYLOR. 1987. Behavioral interactions between two desmognathine salamander species: Importance of competition and predation. *Ecology* **68**: 1453-1458.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH & T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- SHARBEL, T. F. & J. BONIN. 1992. Northernmost record of *Desmognathus ochrophaeus*: Biochemical identification in the Chateauguay River drainage Bassin, Quebec. *Journal of Herpetology* **26** : 505-508.
- SHARBEL, T. F., J. BONIN, L. A. LOWCOCK & D. M. GREEN. 1995. Partial genetic compatibility and unidirectional hybridization in syntopic populations of the salamanders *Desmognathus fuscus* and *D. ochrophaeus*. *Copeia* **1995**: 466-469.
- SHEALY, R. M. 1975. Factors influencing activity in the salamanders *Desmognathus ochrophaeus* and *D. monticola* (Plethodontidae). *Herpetologica* **31**: 94-102.

- SHELFORD, V. E. 1913. The reactions of certain animals to gradients of evaporating power of air: A study in experimental ecology. *Biological Bulletin* **25**: 79-120.
- SMITH, E. M. & F. H. POUGH. 1994. Intergeneric aggression among salamanders. *Journal of Herpetology* **28**: 41-45.
- SMOUSE, P. E., J. C. LONG & R. R. SOKAL. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology* **35**: 627-632.
- SOKAL, R. R. & P. H. A. SNEATH. 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco.
- SOUTHERLAND, M. T. 1986a. Behavioral interactions among four species of the salamander genus *Desmognathus*. *Ecology* **67**: 175-181.
- SOUTHERLAND, M. T. 1986b. The effects of variation in streamside habitats on the composition of mountain salamander communities. *Copeia* **1986**: 731-741.
- SOUTHERLAND, M. T. 1986c. Coexistence in three congeneric salamanders: The importance of habitat and body size. *Ecology* **67**: 721-728.
- SPIGHT, T. M. 1967. The water economy of salamanders: Exchange of water with the soil. *Biological Bulletin* **132**: 126-132.
- SPIGHT, T. M. 1968. The water economy of salamanders: evaporative water loss. *Physiological Zoology* **41**: 195-203.
- SPOTILA, J. R. 1972. Role of temperature and water in the ecology of lungless salamanders. *Ecological Monographs* **42**: 95-125.
- SPOTILA, J. R. & E. N. BERMAN. 1976. Determination of skin resistance and the role of the skin in controlling water loss in amphibians and reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology* **55A**: 407-411.
- TAUB, F. B. 1961. The distribution of the red-backed salamander, *Plethodon c. cinereus*, within the soil. *Ecology* **42**: 681-698.
- TER BRAAK, C. J. F. 1986. Canonical correspondence analysis: A new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* **67**: 1167-1179.

- TER BRAAK, C. J. F. 1987. CANOCO – a FORTRAN program for canonical community ordination by (partial) (detrended) (canonical) correspondance analysis, principal component analysis and redundancy analysis (version 2.1). TNO Institute of Applied computer Science, Wageningen.
- TER BRAAK, C. J. F. & I. C. PRENTICE. 1988. A theory of gradient analysis. *Advances in Ecological Research*. **18** : 271-317.
- TER BRAAK, C. J. F. & P. SMILAUER. 1998. CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows : Software for Canonical Community Ordination (version 4). Microcomputer Power (Ithaca, NY, USA).
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN & D. G. HIGGINS. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.
- THORSON, T. B. & A. SVIHLA. 1943. Correlation of the habitats of amphibians with their ability to survive the loss of body water. *Ecology* **24**: 374-381.
- TILLEY, S. G. 1969. Variation in the dorsal pattern of *Desmognathus ochrophaeus* at Mt. Mitchell, North Carolina, and elsewhere in the southern Appalachian Mountains. *Copeia* **1969**: 161-175.
- TILLEY, S. G. 1970. Aspects of the reproductive and population ecology of *Desmognathus ochrophaeus* in the southern Appalachian Mountains. Ph.D. Thesis. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan.
- TILLEY, S. G. 1972. Aspects of parental care and embryonic developpement in *Desmognathus ochrophaeus*. *Copeia* **1972**: 532-540.
- TILLEY, S. G. 1973a. *Desmognathus ochrophaeus* Cope. Mountain dusky salamander. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles*, pp. 129.1-129.4.
- TILLEY, S. G. 1973b. Life histories and natural selection in populations of the salamander *Desmognathus ochrophaeus*. *Ecology* **54**: 3-17.
- TILLEY, S. G. 1973c. Observations on the larval period and female reproductive ecology of *Desmognathus ochrophaeus* (Amphibia: Plethodontidae) in western North Carolina. *The American Midland Naturalist* **89**: 394-407.

- TILLEY, S. G. 1974. Structures and dynamics of populations of the salamander *Desmognathus ochrophaeus* cope in different habitats. *Ecology* **55**: 808-817.
- TILLEY, S. G. 1980. Life histories and comparative demography of two salamander populations. *Copeia* **1980**: 806-821.
- TILLEY, S. G. 1981. A new species of *Desmognathus* (Amphibia: Caudata: Plethodontidae) from the southern Appalachian Mountains. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan* **695**:1-23.
- TILLEY, S. G. 1988. Hybridization between two species of *Desmognathus* (Amphibia: Caudata: Plethodontidae) in the Great Smoky Mountains. *Herpetological Monographs* **2**: 27-39.
- TILLEY, S. G. 1997. Patterns of genetic differentiation in Appalachian *Desmognathine* salamanders. *Journal of Heredity* **88**: 305-315.
- TILLEY, S. G. & M. J. MAHONEY. 1996. Patterns of genetic differentiation in salamanders of the *Desmognathus ochrophaeus* complex (Amphibia: Plethodontidae). *Herpetological Monographs* **10**: 1-42.
- TILLEY, S. G. & P. M. SCHWERDTFEGER. 1981. Electrophoretic variation in Appalachian populations of the *Desmognathus fuscus* complex (Amphibia: Plethodontidae). *Copeia* **1981**: 109-119.
- TILLEY, S. G. & D. W. TINKLE. 1968. A reinterpretation of the reproductive cycle and demography of the salamander *Desmognathus ochrophaeus*. *Copeia* **1968**: 299-303.
- TILLEY, S. G., R. B. MERRITT, B. WU & R. HIGHTON. 1978. Genetic differentiation in salamanders of the *Desmognathus ochrophaeus* complex (Plethodontidae). *Evolution* **32**: 93-115.
- TITUS, T. A. & A. LARSON. 1996. Molecular phylogenetics of *Desmognathine* salamanders (Caudata: Plethodontidae): A reevaluation of evolution in ecology, life history, and morphology. *Systematic Biology* **45** : 451-472.
- UZENDOSKI, K. E., E. MAKSYMOWITZ & P. VERRELL. 1993. Do the risk of predation and intermale competition affect courtship behavior in the salamander *Desmognathus ochrophaeus*? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **32**: 421-427.
- VERRELL, P. A. 1989. Male mate choice for fecund females in a plethodontid salamander. *Animal Behaviour* **38**: 1086-1088.

- VERRELL, P. A. 1990a. Test for sexual isolation among sympatric salamanders of the genus *Desmognathus*. *Amphibia-Reptilia* **11**: 147-153.
- VERRELL, P. A. 1990b. Sexual compatibility among plethodontid salamanders: Tests between *Desmognathus apalachicolae*, and *D. ochrophaeus* and *D. fuscus*. *Herpetologica* **46**: 415-422.
- VERRELL, P. A. 1990c. Frequency of interspecific mating in salamanders of the plethodontid genus *Desmognathus* : different experimental designs may yield different results. *Journal of Zoology (London)* **221**: 441-451.
- VERRELL, P. A. & S. G. TILLEY. 1992. Population differentiation in plethodontid salamanders: Divergence of allozymes and sexual compatibility among populations of *Desmognathus imitator* and *D.ochrophaeus* (Caudata: Plethodontidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **104**: 67-80.
- VINES, T. H., S. C. KÖLER, M. THIEL, I. GHIRA, T. R. SANDS, C. J. MACCALLUM, N. H. BARTON & B. NÜRNBERGER. 2003. The maintenance of reproductive isolation in a mosaic hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*. *Evolution* **57**: 1876-1888.
- WAKE, D. B. 1991. Homoplasy: The result of natural selection, or evidence of design limitations? *American Midland Naturalist* **183**: 543-567.
- WAKE, D. B. 1993. Phylogenetic and taxonomic issues relating to salamanders of the family Plethodontidae. *Herpetologica* **49**: 229-237.
- WERNER, Y. L. & G. F. WATSON. 1996. Hybridization and systematics in herpetology. *Israel Journal of Zoology* **42**: 93-94.
- WHITEMAN, H. H. & S. A. WISSINGER. 1991. Differences in the antipredator behavior of three plethodontid salamanders to snake attack. *Journal of Herpetology* **25**: 352-355.
- WHITFORD, W. G. & V. H. HUTCHISON. 1967. Body size and metabolic rate in salamanders. *Physiological Zoology* **40**: 127-133.
- WILDER, I. W. 1913. The life history of *Desmognathus fusca*. *Biological Bulletin* **64**: 1423-1429.

- WYMAN, R. L. 1988. Soil acidity and moisture and the distribution of amphibians in five forests of south-central New York. *Copeia* **1988**: 394-399.
- WYMAN, R. L. & D. S. HAWKSLEY-LESCAULT. 1987. Soil acidity affects distribution, behavior, and physiology of the salamander *Plethodon cinereus*. *Ecology* **68**: 1819-1827.
- WYMAN, R. L. & J. JANCOLA. 1992. Degree and scale of terrestrial acidification and amphibian community structure. *Journal of Herpetology* **26**: 392-401.
- YOUNG, G. I. & R. H. YAHNER. 2003. Distribution of, and microhabitat use by, woodland salamanders along forest-farmland edges. *The Canadian Field Naturalist* **117**: 19-24.

APPENDIX I

Form used during the stream salamander survey of Covey Hill