

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC EN OUTAOUAIS

GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE TORTUES MOUCHETÉES (EMYDOIDEA BLANDINGII) EN
OUTAOUAIS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

DAPHNÉE BERNIER

SEPTEMBRE 2025

REMERCIEMENTS

Je souhaite d'abord remercier du fond du cœur mon directeur Yann Surget-Groba pour l'unique et fantastique opportunité que fut ma maîtrise. Sans ton encadrement, tes encouragements et ton support, je ne me serais pas rendu aussi loin. Ce projet m'a permis non seulement d'acquérir de l'expérience et de nouvelles compétences, mais aussi de découvrir nombreuses de mes forces, grâce à tes judicieux conseils et à ta confiance. Je remercie également du fond du cœur Baptiste Postaire, post-doctorant de notre laboratoire, pour son écoute, son soutien et ses recommandations. Ce mémoire ne serait pas ce qu'il est sans toi. Mille merci à tous les deux pour ces belles années!

Un nombre infini de merci à Frédéric Moore, mon fiancé, mon confident, mon ancre. Je ne peux correctement exprimer à quel point tu as été essentiel à l'accomplissement de ce projet. Ton soutien inconditionnel et tes encouragements quotidiens m'ont permis d'avancer malgré les obstacles, et je t'en serai pour toujours reconnaissante.

Je tiens ensuite à remercier Marc-André Bernier et Mireille Auger, pour leur support continu et leur amour inconditionnel. Vous m'avez appris à persévérer, à prendre plaisir à travailler, à profiter de chaque moment et à aimer la nature avec passion. Qui aurait cru que la petite fille qui avait peur des nénuphars aurait maintenant hâte à l'été pour se mettre les pieds dans les marais!

Je souhaite également remercier collègues et stagiaires qui m'ont aidé sur le terrain à collecter nos précieuses données et avec qui j'ai eu de nombreux fous rires en canots : Laura Désilets, Émilie Ladent, Claudie Bouffard, Izaak Régis, Fabienne Lafleur, Matthew McCormack, Augustin Poinssot et Juliette Vêlu. Le projet n'aurait pas eu cette envergure sans vos efforts! Je remercie infiniment Laurence Danvoye pour toute son assistance au laboratoire, ainsi que sa patience et sa joie de vivre contagieuse!

Finalement, je remercie grandement tous les partenaires de ce projet, pour leur expertise, leur confiance et leur soutien tout au long de cette expérience, ainsi que pour cette magnifique opportunité. Je remercie Sylvain Giguère et Pierre-André Bernier du Service canadien de la faune (ECCC), Yohann Dubois, Laurie Bisson-Gauthier, Maxime Tanguay, Simon Pelletier, Émilie Trépanier et Valérie Simard de l'équipe du MELCCFP central, Olivier Cameron Trudel, Maude Côté-Bédard, Kevin Quirion-Poirier et Juliette Larrivée de l'équipe du MELCCFP de l'Outaouais, Francisco Retamal-Diaz, Caroline Gagné et leurs stagiaires, de l'équipe de Conservation Nature Canada. Un merci également à la Commission de la capitale nationale et à Génome Québec pour leur partenariat! À la prochaine saison de terrain!

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	vii
RÉSUMÉ	viii
ABSTRACT	ix
CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 État des connaissances	3
1.2.1 Diversité génétique.....	3
1.2.2 Génétique des populations.....	3
1.2.3 Types d’analyses	6
1.2.4 La tortue mouchetée	7
1.3 Objectifs et hypothèse	11
CHAPITRE 2 ARTICLE : POPULATION GENETICS OF THE BLANDING’S TURTLE (EMYDOIDEA BLANDINGII) IN OUTAOUAIS	12
2.1 Abstract.....	12
2.2 Introduction	13
2.3 Methods	15
2.3.1 Study sites	15
2.3.2 DNA extraction.....	17
2.3.3 Statistical analysis	17
2.4 Results	19
2.4.1 Genetic variability	19
2.4.2 Population genetics	20
2.4.3 Effective population size.....	24
2.5 Discussion.....	25
2.5.1 Genetic variability and Population differentiation in Quebec.....	25
2.5.2 Future of populations	29

CHAPITRE 3 CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....32

ANNEXE A Microsatellite sequences35

ANNEXE B Tail sequences.....36

ANNEXE C Chi2 test values for Hardy-Weinberg equilibrium37

ANNEXE D Allelic frequencies.....38

ANNEXE E STRUCTURE results for complete dataset41

ANNEXE F DAPC sample location assignation, location of origin and percentage of correct assignation for sampling location with at least 10 individuals42

ANNEXE G PCA Plot of the three demes43

ANNEXE H DAPC sample location assignation, location of origin and percentage of correct assignation for the three demes44

ANNEXE I Values of N_e according to age of first reproduction.....45

RÉFÉRENCES46

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1. Delaunay triangulation graph of the seven sampling locations composed of at least ten individuals.....	22
Figure 2.2. Scatter plot of all 224 individuals analysed, divided by deme of origin.....	24
Figure E.1. Mean $\ln P(K)$ of the complete dataset after Bayesian clustering analysis in STRUCTURE.	41
Figure G.1. PCA plot of the three demes.	43

LISTE DES TABLEAUX

Table 2.1 Number of individuals analysed by sampling location and year captured.....	16
Table 2.2. Microsatellites loci used to assess <i>E. blandingii</i> genetic structure in the Outaouais metapopulation.	18
Table 2.3. Sample size, observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), allele range and average allelic richness for the seven sampling locations of Blanding's turtle with a minimum of ten individuals and for all samples combined.	20
Table 2.4. Pairwise Jost's D between all sampling locations with a minimum of ten individuals.....	21
Table 2.5. AMOVA results for testing genetic differentiation between individuals from Quebec and from Ontario.	21
Table 2.6. Pairwise Jost's D between the demes.	23
Table 2.7. AMOVA results for testing genetic differentiation between sampling locations of at least ten individuals and the three demes.	23
Table 2.8. Effective population size for the studied area in Outaouais.	25
Table 2.9. Effective population size for the three demes.	25
Table A.1. Microsatellite sequences.....	35
Table B.2. Tail sequences.	36
Table C.1. χ^2 test values for Hardy-Weinberg equilibrium for the whole dataset and by population.	37
Table D.1. Allelic frequencies for the sampling locations with at least 10 individuals.	38
Table F.1. Sample location assignation vs location of origin for the six sampling locations with a minimum of ten individuals.	4
Table F.2 Percentage of correct assignation for the six sample locations with a minimum of ten individuals.	42
Table H.1. Sample location assignation vs location of origin for the three demes.	44
Table H.2 Percentage of correct assignation for the three demes.	44
Table I: Values of N_e according to the age of first reproduction.	45

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ABRÉVIATIONS EN FRANÇAIS

COSEPAC	Comité sur la situation des espèces en péril au Canada
ECCC	Environnement et Changement climatique Canada
ÉHW	Équilibre d'Hardy-Weinberg
ÉRTQ	Équipe de rétablissement des tortues du Québec
GLSL	Grands Lacs et du Saint-Laurent (population des)

ABRÉVIATIONS EN ANGLAIS

AMOVA	Analysis of molecular variance
COSEWIC	Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada
DAPC	Discriminant analysis of principal components
DU	Designatable unit

RÉSUMÉ

GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE TORTUES MOUCHETÉES (*EMYDOIDEA BLANDINGII*) EN OUTAOUAIS

L'évaluation de la connectivité génétique et de la diversité des populations naturelles est un élément clé pour des plans de conservation et de gestion efficaces. Notre recherche vise à décrire la structure génétique et la taille efficace de la population (N_e) de la tortue mouchetée (*Emydoidea blandingii*) en Outaouais (Québec, Canada) et dans la Ceinture de verdure d'Ottawa (Ontario, Canada), à la limite nord de l'aire de répartition de cette espèce en voie de disparition. Nous avons génotypé douze microsatellites de 266 individus, échantillonnés dans 19 milieux humides entre 2021 et 2023 pour tester si : (a) les individus d'*E. blandingii* en Outaouais sont génétiquement différents de l'Ontario, indiquant que la rivière des Outaouais crée une barrière au flux génétique; et si (b) les individus d'*E. blandingii* en Outaouais représentent une métapopulation de groupes d'individus génétiquement différents, et non une seule population panmictique comme supposé présentement. Il n'y avait aucune preuve de différenciation génétique entre les individus du Québec et de l'Ontario, ce qui indique que la rivière des Outaouais ne constitue pas un obstacle au flux génique. Cependant, une différenciation génétique significative a été constatée entre les sites d'échantillonnage en Outaouais, révélant que *E. blandingii* ne forme pas une population panmictique au Québec. Enfin, N_e a été estimé à 159 individus d'*E. blandingii* en Outaouais. L'absence de panmixie et la petite taille efficace de la population incitent à un changement dans la manière dont l'espèce est présentement gérée dans cette zone. Même si la protection locale des milieux humides pourrait être bénéfique pour protéger les différents dèmes de l'Outaouais, des suivis à long termes et des politiques coordonnées à l'échelle du Québec et de l'Ontario sont également nécessaires.

Mots clés : génétique des populations, *Emydoidea blandingii*, structure des populations, taille efficace de population, microsatellites

ABSTRACT

POPULATION GENETICS OF THE BLANDING'S TURTLE (*EMYDOIDEA BLANDINGII*) IN OUTAOUAIS

Assessing the genetic connectivity and diversity of natural populations is a key component for efficient conservation and management plans. Our research aims to describe the genetic structure and the effective population size (N_e) of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*) in Outaouais (Quebec, Canada) and Ottawa's Greenbelt (Ontario, Canada), at the northern edge of this endangered species' range. We genotyped 266 individuals with twelve microsatellites, sampled from 19 wetlands between 2021 and 2023 to test if: (a) *E. blandingii* in Outaouais are genetically different from Ontario, due to the Ottawa River creating a barrier to gene flow; and (b) *E. blandingii* in Outaouais represents a metapopulation of genetically different groups, and not a single panmictic population as currently assumed. There was no evidence of genetic differentiation between individuals from Quebec and Ontario, indicating that the Ottawa River is not a barrier to gene flow. However, significant genetic differentiation was found between sampling locations in Outaouais, revealing that *E. blandingii* does not form a panmictic population in Quebec. Finally, N_e was estimated at 159 *E. blandingii* individuals in Outaouais. The absence of panmixia and the small effective population size call for a change in how the species is currently managed in this area. While local protection of wetlands could be beneficial to protect the different demes in Outaouais, long term monitoring and coordinated policies across Quebec and Ontario are also necessary.

Keywords: population genetics, *Emydoidea blandingii*, population structure, effective population size microsatellites

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans ce chapitre, la problématique et un état des connaissances sont abordés. Tout d'abord, la problématique générale de la génétique de la conservation est présentée, suivie de l'espèce sujet de l'étude et d'une description indiquant comment ce projet s'inscrit dans cette problématique. Dans l'état des connaissances, un portrait est réalisé des concepts clés en diversité génétique et en génétique des populations et des analyses réalisées. Les informations connues sur la tortue mouchetée ainsi que les études génétiques ayant été faites précédemment à travers son aire de répartition sont présentées. Finalement l'objectif et les hypothèses du projet sont détaillés.

1.1 Problématique

La diversité génétique des populations est un enjeu important dans les petites populations fragmentées, particulièrement dans le cas des espèces en péril (Manel & Holderegger, 2013; Primack, 1993). Le faible nombre d'individus matures et la distance physique séparant les sous-populations augmentent le risque de consanguinité et diminuent le flux génique, ce qui affecte négativement la diversité génétique des populations (Allendorf, 1983; Frankham, 1995a; Keller & Waller, 2002; Nei et al., 1975; Varvio et al., 1986). Cette diversité est cependant essentielle pour la viabilité et la résilience des populations, permettant par exemple l'adaptation à l'environnement ou la résistance à de nouvelles maladies et diminuant le risque de dépression de consanguinité (Keller & Waller, 2002; Manel & Holderegger, 2013; O'Brien & Evermann, 1988; Primack, 1993).

Évaluer la structure génétique des populations, et donc la répartition de la diversité génétique à différentes échelles spatiales, permet d'obtenir de l'information sur plusieurs facettes, dont le niveau de consanguinité et la connectivité des populations (Balkenhol et al., 2016). Toutes ces informations sont importantes dans l'évaluation de la viabilité des populations d'espèces en péril, et devraient être prises en compte lors de la détermination de l'état des espèces et de la gestion des populations (Fraser & Bernatchez, 2001; Kronenberger et al., 2017; Moritz, 1994).

En Outaouais, l'une des espèces susceptibles à cette problématique est la tortue mouchetée (*Emydoidea blandingii*), une espèce menacée de tortue d'eau douce du sud du Québec. Retrouvée uniquement en Amérique du Nord, environ 20% de son aire de répartition se retrouve au Canada, soit en

Ontario, au Québec et en Nouvelle-Écosse (COSEPAC, 2016). Au Canada, deux unités de gestions ont été désignées : la population de Nouvelle-Écosse, isolée au niveau spatial et génétique, et la population des Grands Lacs et du Saint-Laurent (GLSL), connectée à l'aire de distribution principale aux États-Unis. Elle est présente en petites sous-populations dépassant rarement les 200 individus (ECCC, 2018). Les populations canadiennes sont présentement en déclin et sont protégées au niveau légal (COSEPAC, 2016; ECCC, 2018). La population de la Nouvelle-Écosse a d'abord été inscrite à la Loi des espèces en péril du Canada et désignée «menacée» en 1993, puis «en voie de disparition» en 2005 (COSEPAC, 2016). La population GLSL a quant à elle été inscrite à la LEP et désignée «menacée» en 2005, puis «en voie de disparition» en 2016. C'est durant cette même année que l'espèce a été désignée «espèce menacée d'extinction» au niveau mondial par l'Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) (COSEPAC, 2016; ECCC, 2018; ÉRTQ, 2020). Au Québec, elle est désignée «menacée» depuis 2009 sous la Loi sur les espèces menacées et vulnérables (ÉRTQ, 2020).

L'unité de gestion GLSL est considérée comme une population formée de sous-populations, et les individus du Québec sont considérés comme une seule sous-population de cette unité (COSEPAC, 2016; ÉRTQ, 2020). Cependant, aucune étude de la structure génétique n'a été réalisée au Québec. Étant donné la forte présence humaine sur le territoire occupé par cette espèce, celui-ci est fortement fragmenté par les activités anthropiques. Il est donc possible que des dèmes, soit des groupes d'individus isolés génétiquement au point d'être considérés des populations ou sous-population différentes (Balkenhol et al., 2016), existent au sein de la sous-population du Québec.

Cette problématique amène donc une question importante : quelle est la structure génétique des tortues mouchetées en Outaouais? Le présent projet tente de répondre à cette question, en ayant pour objectif principal d'évaluer la connectivité et la diversité génétique des tortues mouchetées en Outaouais.

Ce projet de recherche s'inscrit sous les objectifs, stratégies et mesures des programmes de rétablissement de la tortue mouchetée au Canada et au Québec. Au niveau fédéral, il poursuit l'objectif «d'assurer la viabilité des populations locales» (ECCC, 2018). Il correspond également aux stratégies de Relevés et suivi, en «approfondissant les connaissances sur les populations locales» et de Recherche en «déterminant les exigences minimales en matière de [...] population pour assurer la viabilité des espèces locales» (ECCC, 2018). Au niveau provincial, il correspond à deux actions. Il permettra «d'améliorer les

connaissances sur la connectivité entre les populations locales» (mesure 7, action b) et «d'évaluer et suivre la viabilité et la vulnérabilité des populations connues» (mesure 8, action a) (ÉRTQ, 2020).

Selon les résultats, cette étude a le potentiel de mener à la désignation de populations isolées génétiquement en tant qu'unités de gestion indépendantes (Fraser & Bernatchez, 2001; Moritz, 1994).

1.2 État des connaissances

1.2.1 Diversité génétique

Préserver les processus évolutifs et la viabilité des espèces est l'un des buts de la biologie de la conservation, et celui-ci ne peut être accompli qu'en maintenant une diversité génétique suffisante pour assurer la résistance et la résilience de l'espèce (Fraser & Bernatchez, 2001; Primack, 1993). La génétique de la conservation est une partie nécessaire des efforts de conservation (Primack, 1993) et informe autant sur le potentiel évolutif que la précarité des populations qui composent l'espèce (Fraser & Bernatchez, 2001; Moritz, 1994; Varvio et al., 1986). En effet, les conséquences d'un événement stochastique seront différentes pour une grande population et pour une petite population isolée (Balkenhol et al., 2016; Primack, 1993; Shaffer, 1987). Les populations génétiquement isolées peuvent avoir des potentiels évolutifs différents et ainsi être désignées comme Unité significative au niveau évolutif (*Evolutionarily significant units*), désignation qui peut servir dans la priorisation à long terme des taxons et populations à conserver (Fraser & Bernatchez, 2001; Moritz, 1994). Des populations ayant des fréquences alléliques significativement différentes peuvent aussi être désignées comme Unités de gestion différentes (*Management units*) (Moritz, 1994), indiquant que les mesures de conservation à court terme doivent être adaptées pour chacune. Dans les deux désignations, il est préférable de ne pas mélanger les individus de deux unités, même lors d'efforts de renforcement des populations, pour éviter la dépression hybride, soit une réduction de la valeur sélective des individus découlant d'un croisement entre populations différenciées (Frankham et al., 2011; Moritz, 1994). La diversité et la structure génétique des populations d'une espèce menacée doivent donc être prises en compte lors de sa gestion et de l'élaboration des plans de rétablissement (Fraser & Bernatchez, 2001; Kronenberger et al., 2017; Moritz, 1994), sans toutefois éclipser les autres aspects de la conservation (Taylor & Dizon, 1999).

1.2.2 Génétique des populations

L'évaluation de la structure génétique part du modèle d'Hardy-Weinberg développé en 1908, basé sur les fréquences alléliques (Hardy, 1908; Weinberg, 1908). Ce modèle indique que pour une population

panmictique (où l'accouplement se fait de façon aléatoire) de taille infinie, sans migration, mutation ni sélection, les fréquences alléliques ne changeront pas entre générations et les fréquences génotypiques pourront être prédites à partir des fréquences alléliques. Une telle population est dite à l'«Équilibre d'Hardy-Weinberg» (ÉHW). Or, les populations réelles ne respectent jamais les conditions d'une population idéale, ce qui peut entraîner un déséquilibre des fréquences génotypiques (Balkenhol et al., 2016; De Meeûs, 2018). Des populations de petite taille seront plus affectées par la dérive génétique ainsi que par l'augmentation de la consanguinité (Bouzat et al., 1998; Grossen et al., 2020; Hohenlohe et al., 2021; Nei et al., 1975). Cela se traduira par une perte de diversité génétique et une diminution de l'hétérozygotie par rapport à ce qui serait attendu dans une population à l'ÉHW. À l'inverse, la migration d'individus reproducteurs d'une population à une autre peut ralentir la perte de diversité génétique (Balkenhol et al., 2016; Keller & Waller, 2002). La distance génétique entre deux populations ou entre deux sous-populations peut être mesurée en comparant les fréquences alléliques observées à celles attendues si les deux formaient une seule population idéale. Plus les fréquences alléliques sont différentes entre deux populations, plus la distance génétique sera élevée et plus les deux populations seront considérées isolées (Balkenhol et al., 2016).

Comme la connectivité des populations est liée à la distribution spatiale de celles-ci dans le paysage où elles se trouvent et à la capacité des individus à s'y déplacer (Balkenhol et al., 2016), il est important de choisir le modèle de population approprié sur lequel baser l'étude. Parmi les nombreux modèles existants, deux retiennent l'attention dans le cas de cette étude, puisqu'ils représentent l'état actuellement assumé chez la tortue mouchetée en Outaouais (la population idéale (COSEPAC, 2016)) et l'état de l'espèce dans d'autres régions de son aire de répartition (métapopulation (Jordan et al., 2024; McGuire et al., 2013)). Le premier est celui de la population idéale panmictique sans migration, sélection, mutation ni dérive, comme utilisé dans la théorie d'Hardy-Weinberg. Dans le deuxième modèle, celui de la métapopulation, celle-ci est composée de plusieurs sous-populations panmictiques plus ou moins connectées dans l'espace. Chacune de ces sous-populations a un risque d'extinction et une probabilité de colonisation, selon les mouvements possibles entre les habitats. Une métapopulation est soutenue tant que le taux d'extinction est inférieur ou égal au taux de colonisation (Hey & Machado, 2003). Une augmentation de la fragmentation du paysage peut par exemple isoler davantage les sous-populations en limitant les mouvements et diminuant le taux de colonisation, fragilisant ainsi la métapopulation (Taylor et al., 1993). Cependant, en réalité, le choix d'un partenaire sexuel peut être influencé par la distance entre les individus et celle qu'ils peuvent parcourir dans un paysage non-uniforme. Les flux géniques peuvent donc être

affectés par ces distances et la difficulté à traverser un type d'habitat donné, rendant les métapopulation non-panmictiques (Balkenhol et al., 2016; Wright, 1943).

Le paysage peut être défini de plusieurs façon, selon l'angle abordé. En génétique du paysage, il peut être décrit de la façon suivante :

Un système de processus et patrons écologiques en interaction, à une échelle donnée, et qui peut être considéré comme un espace spatialement hétérogène en au moins un facteur d'intérêt pour la relation processus-patron étudié (traduction de Balkenhol et al., 2016).

Il peut être considéré comme une mosaïque de plusieurs types d'habitats, et la perte et la fragmentation d'habitats favorables pour une espèce sont des forces majeures qui affectent les flux géniques. La perte d'habitat, soit la diminution de la superficie de l'habitat, réduit la quantité de ressources disponibles et donc réduit la taille de la population qu'il peut abriter (Fahrig, 2003; Jackson & Fahrig, 2016). Cela a pour effets potentiels d'augmenter la dérive génétique et la consanguinité, et par conséquent diminuer la diversité génétique (Bouzat et al., 1998; Grossen et al., 2020; Hohenlohe et al., 2021; Nei et al., 1975). Cela peut également changer la dynamique d'une métapopulation en augmentant le risque d'extinction d'une sous-population clé et fragiliser l'espèce, tout en changeant sa structure génétique (Varvio et al., 1986). La fragmentation d'habitat, soit la perte de connectivité entre deux parts d'un habitat auparavant continu, est presque toujours le résultat d'une perte d'habitat et amplifie les effets négatifs sur les flux géniques chez de nombreuses espèces (Fahrig, 2003; Jackson & Fahrig, 2016). En effet, si la distance et la résistance du paysage entre les fragments d'habitats sont trop grandes, le mouvement des individus entre les sous-populations créées peut être limité au point qu'une sous-population devienne isolée fonctionnellement (McCoy & Mushinsky, 1999). Sans migration, cette sous-population sera davantage sujette à la dérive génétique et à la perte de diversité génétique, et deviendra isolée génétiquement avec le temps (Balkenhol et al., 2016; Frankham, 1995a; Nei et al., 1975; Varvio et al., 1986).

L'isolement fonctionnel d'une population peut d'abord être créé par une distance trop grande à parcourir (McCoy & Mushinsky, 1999; Taylor et al., 1993). La distance linéaire, soit la distance entre deux point la plus courte possible, peut être la cause de cet isolement fonctionnel (Mantel, 1967; Slatkin, 1993; With, 2019). Cependant, dans un paysage hétérogène et pour une espèce donnée, le trajet le plus court est parfois impossible ou plus difficile à réaliser qu'un autre en raison d'habitats plus résistants aux mouvements ou de barrières naturelles ou humaines. La topographie, le couvert végétal, les cours d'eau, les routes, les terrains agricoles et les infrastructures anthropiques en sont des exemples (Balkenhol et al.,

2016; Storfer et al., 2010; With, 2019; Wright, 1931). Les barrières qui empêchent complètement le mouvement des individus varient selon les espèces (Storfer et al., 2010). Ces barrières jouent un rôle important dans la structure génétique des populations. En effet, en empêchant le mouvement des individus, elles augmentent les risques d'isolement et les risques de perte de diversité génétique. Il est donc important de les identifier dans le cadre d'une gestion adéquate des espèces (Balkenhol et al., 2016; Storfer et al., 2010). La distance réelle à parcourir entre deux populations peut donc être plus grande que la distance linéaire (McRae & Beier, 2007) et, selon la capacité de déplacement de l'espèce, peut devenir trop grande pour permettre la migration (Taylor et al., 1993).

1.2.3 Types d'analyses

1.2.3.1 Centrées sur les individus

Deux grands types de méthodes existent pour évaluer la structure génétique des populations, soit les méthodes centrées sur les individus et celles centrées sur les populations. Le premier type regroupe les analyses centrées sur les individus. La méthode des groupes bayésiens (Bayesian clusters) fait partie de ce type d'analyses, en définissant l'individu comme unité d'analyse. En assumant que les populations sont à l'ÉHW, cette technique tente de diviser les individus en groupe selon leur génotype en cherchant à limiter les déviations de l'ÉHW. Elle est donc utile pour identifier les sous-populations potentielles et les barrières aux déplacements (Balkenhol et al., 2016; Storfer et al., 2010). Cette méthode est fréquemment utilisée en génétique étant donné qu'elle ne requiert pas d'hypothèses spatiales ni de groupes de populations prédéterminés (Anthonysamy et al., 2018; Balkenhol et al., 2016; Jombart et al., 2010; McCluskey et al., 2016; McGuire et al., 2013; Sethuraman et al., 2014; Storfer et al., 2010). La méthode d'analyse discriminante des composantes principales (*Discriminant analysis of principal components*, (DAPC)) est également centrée sur les individus. Cette analyse tente de diviser les individus en maximisant les différences génétiques entre les groupes, tout en limitant les différences à l'intérieur de ceux-ci. Plus performante au niveau de la vitesse de traitement que les groupes bayésiens lors de larges bases de données et ne se basant pas sur des modèles prédéfinis (comme l'ÉHW), elle a le potentiel d'identifier des structures génétiques plus complexes (Jombart et al., 2010).

1.2.3.2 Centrées sur les populations

Dans le deuxième type de méthodes pour évaluer la structure génétique des populations, la statistique F_{ST} de Wright est communément utilisée pour décrire la différenciation des sous-populations par rapport à la population totale (Balkenhol et al., 2016; McCluskey et al., 2016; McGuire et al., 2013; Mockford et al.,

2005, 2007; Reid et al., 2017; Sethuraman et al., 2014; Weir & Cockerham, 1984). Cette approche consiste à calculer la différence entre les fréquences alléliques attendue si la population totale était panmictique et la proportion réelle (Balkenhol et al., 2016; Weir & Cockerham, 1984). Différentes variations ont été créés pour s'adapter à des cas plus complexes, comme les statistiques G_{ST} , pour des locus à plus de deux allèles, ou le D de Jost, pour les cas de haut niveau d'hétérozygotie ou de petites populations (Balkenhol et al., 2016; Hedrick, 2005; Jost, 2008). Les valeurs de F_{ST} et ses équivalents peuvent être calculées par paires de populations pour vérifier leur connectivité. C'est aussi cet indice qui est utilisé dans l'estimation de l'isolement par la distance. En effet, une matrice de distance génétique de valeurs de F_{ST} pour chaque paire de population peut être jumelée à une matrice de distance physique afin de voir s'il y a une corrélation, validé par le test de Mantel (Mantel, 1967; Rousset, 1997; Slatkin, 1993).

Une autre analyse génétique pertinente à faire en conservation est la taille efficace d'une population (N_e). Comme la taille réelle d'une population (N_c) est difficile à estimer et ne donne pas d'informations sur le potentiel adaptatif (Frankham, 1995b; Schwartz et al., 2007), N_e est plus couramment utilisé lors de l'évaluation et la prise de décision en conservation (Alacs et al., 2007; Hohenlohe et al., 2021; Wang et al., 2016). N_e est défini comme «la taille d'une population idéale qui démontrerait le même taux de dérive génétique que la population d'intérêt» (Crow, 2010; Wright, 1931) et est une composante clé de la diversité génétique d'une espèce puisqu'elle représente le potentiel adaptatif et le fardeau génétique (Hohenlohe et al., 2021). La méthode choisie est celle basée sur la méthode du déséquilibre de liaison (Hill, 1981) puisqu'elle est préférable dans les petites populations, elle ne requiert qu'un seul échantillonnage de microsatellites (Nadachowska - Brzyska et al., 2022; Wang et al., 2016) et elle peut être ajustée selon la longévité et l'âge de première reproduction d'une espèce (Waples et al., 2014).

1.2.4 La tortue mouchetée

Emydoidea blandingii est une espèce de tortue semi-aquatique d'eau douce retrouvée au Québec, en Ontario, en Nouvelle-Écosse et dans plusieurs états américains autour des Grands Lacs. Elle utilise à la fois les milieux aquatiques et des habitats terrestres pour la thermorégulation, les déplacements et l'estivation, les milieux humides (marais, tourbières, etc.) et les forêts étant les habitats favorisés (Beaudry et al., 2009; Joyal et al., 2001; Rowe, 1987; St-Hilaire, 2003). Par contre, les rivières ne sont généralement pas fréquentées par cette espèce de tortue, plusieurs étant considérées comme des barrières au flux de gènes (Mockford et al., 2007; Sethuraman et al., 2014). Les milieux humides sont également utilisés pour l'hibernation et l'accouplement, tandis qu'elle nidifie dans les milieux terrestres plus ouverts comme les

plages, les champs, les accotements de routes ou les sablières (Beaudry et al., 2009; Joyal et al., 2001; Rowe & Moll, 1991). Il a été démontré qu'en Ontario, la présence de milieux forestiers et d'autres zones humides autour d'un milieu humide augmente la probabilité de son occupation par l'espèce (Fyson & Blouin-Demers, 2021). Si la tortue mouchetée montre une forte fidélité à son milieu humide de résidence (McGuire et al., 2013; Piepgras & Lang, 2000) et n'en fréquentera que quelques-uns dans sa vie, elle peut effectuer de grands déplacements. En effet, les distances parcourues entre deux milieux humides peuvent être de 2km (Joyal et al., 2001; Piepgras & Lang, 2000). Les routes, les grands lacs et les rivières à débit important ont été relevés comme obstacle au déplacement (COSEPAC, 2016; Davy et al., 2014; Mockford et al., 2007). Les femelles effectuent de plus grandes distances lors de la nidification, allant jusqu'à 6km de son milieu humide (Joyal et al., 2001). Ce déplacement permet une forte probabilité que les nouveau-nés se dispersent dans un site différent de celui des parents, augmentant les flux géniques entre milieux. Les nouveau-nés et juvéniles sont en effet ceux qui effectuent le plus de dispersion (changement de milieux de vie), alors que les adultes montrent une plus grande fidélité à leur domaine vital (McGuire et al., 2013). Cette stratégie, ainsi que la reproduction polygame et polyandre, peuvent permettre à de petites populations de conserver une diversité génétique suffisante malgré le fait que la majorité des femelles s'accouplent avec des mâles du même milieu (COSEPAC, 2016; ECCC, 2018; McGuire et al., 2013).

1.2.4.1 Analyses génétiques précédentes

Dans le cas de cette espèce, plusieurs analyses génétiques ont été effectuées à travers son aire de répartition. L'étude ayant la plus grande échelle a été réalisée en 2007 par Mockford et al (2007). L'équipe a étudié la structure génétique de populations de la Nouvelle-Écosse, de l'Ontario, du Massachusetts, du Minnesota, du Wisconsin, de l'état de New York, du Michigan et de l'Illinois. Les valeurs de F_{ST} par paires de populations variaient entre 0.00 et 0.465, ce qui les a conduits à définir trois groupes génétiquement distincts : la population de la Nouvelle-Écosse, les populations à l'est des Appalaches et le reste des populations à l'ouest des Appalaches. Les auteurs ont trouvé que la distance géographique et la distance génétique étaient positivement corrélées, ce qui démontre l'existence d'un isolement par la distance à l'échelle de l'aire étudiée. Ils ont également présenté l'hypothèse que les Appalaches et la rivière Hudson sont des barrières importantes pour le déplacement des individus, et donc aux flux géniques.

À une échelle plus fine, le même groupe de recherche a étudié la structure génétique des trois populations de Nouvelle-Écosse. Distancées d'au plus 25km, ces populations sont isolées les unes des autres au niveau génétique. Il est estimé qu'il y a absence de migration, par capture-marquage et par télémétrie depuis

1996 (McNeil, 2002; Mockford et al., 2005), mais comme il ne suffit que d'un migrant effectif par population pour maintenir la connectivité génétique (Varvio et al., 1986), la période d'inventaire semble trop courte pour confirmer cette hypothèse. Les auteurs ont calculé des valeurs de F_{ST} variant entre 0.042 et 0.124, toutes statistiquement significatives. Bien que l'isolement par la distance n'ait pas été testée, les auteurs suggèrent que la distance expliquerait mieux la distance génétique que le partage ou non du même bassin versant (Mockford et al., 2005). Cette structure fine a été soulevée à nouveau dans l'étude de 2007, mais semblait absente dans le reste de l'aire répartition (Mockford et al., 2007).

Aux États-Unis, Sethuraman et al. (2014) ont étudié 18 populations de l'Illinois, de l'Iowa, du Minnesota et du Nebraska, séparées d'au plus 1500km environ. Si les auteurs ont également trouvé une faible corrélation positive entre la distance physique et la distance génétique, celle-ci n'expliquait pas la plus grande proportion de la variation génétique, les bassins versants et les limites de la dernière glaciation expliquant des proportions supérieures. L'isolement par la distance était parfois inconstant : certaines des populations peu éloignées avaient des valeurs de F_{ST} élevées et vice-versa. Les valeurs de F_{ST} variaient entre 0.01 et 0.47. Les populations étudiées ont été groupées en 4 à 5 groupes génétiquement différents. Ces résultats étaient en contraste avec l'étude globale de Mockford et al. (2007), qui indiquait qu'il n'y avait pas de structure significative dans cette région à cette échelle.

Une seconde étude états-unienne a également trouvé une relation inconsistante entre la distance géographique et la distance génétique. Anthonysamy et al. (2018) ont étudié six populations de tortues mouchetées de l'Illinois, dans une étude qui incluait également *Clemmys guttata*, *Chrysemys picta* et *Chelydra serpentina*. Pour *E. blandingii*, le flux génique calculé était faible entre les populations, et celles-ci pouvait être regroupées en deux à trois groupes bayésiens génétiquement différents. Les auteurs suggéraient que l'hétérogénéité du paysage et la préférence d'habitats modulaient aussi la structure génétique de cette espèce.

L'étude de Reid et al. (2017) est également une étude portant sur plus d'une espèce, soient *E. blandingii*, *C. picta* et *C. serpentina*. Les résultats pour la tortue mouchetée indiquaient que les 21 populations, éloignées d'au plus 400km, formaient une structure hiérarchique complexe composée de deux groupes bayésiens principaux, un comprenant un sous-groupe, l'autre, six. Plusieurs des populations étaient considérées isolées génétiquement des autres. La distance génétique était dans ce cas-ci plutôt corrélée

avec les composantes anthropiques du paysage. Par exemple, la présence de zones agricoles était fortement associée à une plus grande distance génétique.

Plus au nord, l'équipe de recherche de McCluskey et al. (2016) ont comparé quatre populations de New York et une du sud de l'Ontario, séparée d'au plus 360km. Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre les distances génétiques et géographique. Cependant, les cinq populations pouvaient être distinguées en trois groupes. Deux populations du nord de New York et celle de l'Ontario présentaient des divergences génétiques faibles ($F_{ST} < 0.07$), laissant suggérer que la rivière Saint-Laurent faciliterait les flux géniques, au contraire de la rivière Hudson comme le suggérait Mockford et al. en 2007. Les deux autres populations étaient considérées comme isolées, l'une ayant une faible diversité génétique et l'autre non.

L'étude de Davy et al. (2014) s'est quant à elle concentrée sur les populations de l'Ontario, préalablement considérées comme une seule population panmictique dont la plus grande distance linéaire entre deux sites échantillonnés était de 500km. L'étude a cependant identifié quatre groupes bayésiens génétiquement différents parmi huit sites échantillonnés, réfutant l'hypothèse de panmixie. Toutes les valeurs de F_{ST} entre les paires de sites étaient significatives et variaient entre 0.0397 et 0.0992. Les valeurs de D_{est} ont cependant été favorisées pour démontrer la différenciation entre populations, les auteurs jugeant cette approche plus appropriée. Les valeurs de cet indice variaient entre 0.0569 et 0.1556. Les auteurs ont appuyé l'hypothèse de Mockford et al. (2007) quant au rôle des Appalaches sur l'interruption des flux géniques.

Aucune étude de la structure génétique de cette espèce n'a été effectuée au Québec. Il est présentement présumé que les tortues mouchetées québécoises et ontariennes forment 14 sous-populations spatialement définies de la population GLSL, les tortues du Québec formant une sous-population (ECCC, 2018; ÉRTQ, 2020). Cependant, la structure génétique des individus québécois n'a pas été analysée ni comparée aux populations ontariennes. Les études précédentes conduites dans différentes parties de l'aire de répartition de la tortue mouchetée observent différentes relations entre le niveau de distance génétique et la distance physique à une échelle plus fine, et ce, pour différents loci et différents nombres de loci selon les études. Dans l'aire géographique étudiée dans le présent projet, la rivière des Outaouais sépare les deux provinces et une forte occupation humaine est présente des deux côtés de la rivière. La combinaison de ces éléments rend probable la présence d'une forte structure génétique à petite échelle.

Le présent projet s'avère donc important pour définir les groupes génétiquement différents nécessitant une gestion indépendante et des mesures de conservation adaptées.

1.3 Objectifs et hypothèse

L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer l'état de la connectivité et de la diversité génétique des tortues mouchetées en Outaouais. Pour l'atteindre, deux hypothèses sont testées.

La tortue mouchetée ne fréquente pas les rivières et plusieurs rivières sont considérées comme des barrières aux mouvements des individus. La première hypothèse postule donc que les tortues mouchetées de l'Outaouais sont génétiquement différentes de celles de l'Ontario, la rivière des Outaouais étant une barrière infranchissable limitant les flux de gènes. Si cette hypothèse est vraie, ces groupes auront un niveau élevé de différenciation génétique.

L'aire de distribution de la tortue mouchetée en Outaouais est une mosaïque d'habitats favorables pour l'espèce (milieux humides et forêts), de milieux agricoles, de routes et de zones habitées. En raison de cette fragmentation, la seconde hypothèse est que les tortues mouchetées de l'Outaouais représentent une métapopulation de groupes d'individus génétiquement différents, et non une population panmictique unique comme il est présentement assumé (COSEPAC, 2016). Si cette hypothèse s'avère vraie, il y aura une différenciation génétique significative entre différents groupes d'individus, ci-après appelés «dèmes».

CHAPITRE 2

ARTICLE : POPULATION GENETICS OF THE BLANDING'S TURTLE (*EMYDOIDEA BLANDINGII*) IN OUTAOUAIS

Dans ce chapitre, l'article complet est présenté. L'abstract résume d'abord l'article, puis l'introduction met en contexte l'étude. La méthodologie est ensuite décrite, suivie par les résultats des analyses effectuées. Finalement, la discussion interprète les résultats dans le contexte biologique de l'espèce et énonce diverses recommandations pour la gestion de celle-ci.

2.1 Abstract

Assessing the genetic connectivity and diversity of natural populations is a key component for efficient conservation and management plans. Indeed, genetic studies can identify populations harbouring higher genetic diversity, those presenting a higher evolutionary potential and those that are isolated, thus offering guidelines to prioritize conservation measures. With this optic in mind, our research aims to describe the genetic structure and the effective population size (N_e) of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*) in Outaouais (Quebec, Canada) and Ottawa's Greenbelt (Ontario, Canada), at the northern edge of this endangered species' range. We genotyped twelve microsatellites from 266 individuals, sampled from 19 wetlands between 2021 and 2023 to test if: (a) *E. blandingii* in Outaouais are genetically different from Ontario, due to the Ottawa River creating a barrier to gene flow; and (b) *E. blandingii* in Outaouais represents a metapopulation if genetically different groups, and not a single panmictic population as currently assumed. There was no evidence of genetic differentiation between individuals from Quebec and Ontario, indicating that the Ottawa River is not a barrier to gene flow. However, significant genetic differentiation was found between sampling locations in Outaouais, revealing that *E. blandingii* does not form a panmictic population in Quebec. Finally, N_e was estimated at 159 *E. blandingii* individuals in Outaouais. The absence of panmixia and the small effective population size call for a change in how the species is currently managed in this area. While local protection of wetlands could be beneficial, to protect the different demes in Outaouais, coordinated policies across Quebec and Ontario are also necessary.

2.2 Introduction

Worldwide biodiversity is currently declining at an alarming rate, due to numerous threats, such as land conversion for agriculture, pollution, invasive species and exploitation (Ehrlich & Pringle, 2008; Lande, 1998; Wake & Vredenburg, 2008). Among these, habitat loss is one of the most important as it has severe consequences on natural populations (Primack, 1993). Indeed, habitat loss reduces the amount of resources available (such as food, potential mates, shelter, etc.) and can therefore reduce the population size of a species it supports (Fahrig, 2003; Jackson & Fahrig, 2016). Habitat fragmentation (i.e. the loss of continuity between two parts of a previously large and continuous habitat patch), stemming from habitat loss, can intensify this issue, leading to the loss of connectivity, as synthesized in Fang *et al.* (2018).

Indeed, landscape modifications associated with habitat loss can lead to a decrease of structural connectivity, where the habitat required by a species is now spread across a mosaic of unsuitable landscape patches (P. D. Taylor *et al.*, 2006). If the distance between usable habitat fragments is greater than the species' dispersal capacities or if the landscape characteristics between the two patches restrain its dispersal, functional connectivity (i.e. the intensity to which landscapes facilitate or impede a species' movement between habitats patches)(Taylor *et al.*, 1993) is impacted. The movement of individuals between the demographic units is then limited, thus changing migration rates (Taylor *et al.*, 1993), which can lead to subpopulation becoming functionally and genetically isolated (Balkenhol *et al.*, 2016; McCoy & Mushinsky, 1999), subsequently impacting the dynamics, and the genetic structure of a metapopulation (Balkenhol *et al.*, 2016; Varvio *et al.*, 1986). Over generations, with a reduction of migration rates and thus gene flow, a small, isolated population is more liable to genetic drift and loss of genetic diversity and will accumulate genetic differences and potentially deleterious mutations (Allendorf, 1983; Frankham, 1995a; Nei *et al.*, 1975; Varvio *et al.*, 1986). These small populations are also more sensitive to stochastic events, selective pressures, and inbreeding, threatening genetic diversity furthermore (Keller & Waller, 2002; Lande, 1998; Lynch *et al.*, 1995).

For efficient biodiversity conservation, it is important to understand the population dynamics, biogeographical ranges, life history traits and genetic connectivity of the species of interest (Hohenlohe *et al.*, 2021; Nielsen *et al.*, 2020). One of the first steps is to find which population model best fits the species distribution, as conservation practices will differ for a panmictic population or a metapopulation, which represents a network of genetically connected demographic units (hereafter called demes) (Hey & Machado, 2003). The latter model is commonly associated with species inhabiting patchy habitats

(Baguette, 2004; Fardila et al., 2017). In the context of habitat modifications due to human activities, census sizes of demes, genetic diversity and degree of connection vary through time (Hey & Machado, 2003). Estimating census sizes (N_c ; actual number of individuals) (Frankham, 1995b) and effective population sizes (N_e) is key to have an accurate portrait of the species situation. As N_c can be difficult to assess (Schwartz et al., 2007) and does not provide information on adaptative potential, N_e is more commonly used by conservation practitioners (Alacs et al., 2007; Hohenlohe et al., 2021). N_e is defined the “size of an idealized population that has undergone the same rate of genetic drift as the actual population of interest” (Crow, 2010; Wright, 1931) and is a key component of a species genetic diversity as it represents its adaptative potential and genetic load (Hohenlohe et al., 2021). It is therefore critical to consider genetic connectivity and diversity, including N_e , in conservation (Alacs et al., 2007; Primack, 1993), as it advises management units designation and governance (Kronenberg et al., 2017; Moritz, 1994), and informs on the potential resiliency of populations (Primack, 1993). It is especially important for long-lived organisms, such as turtles (Alacs et al., 2007), where populations undergoing strong genetic diversity loss takes more time to recover (Kuo & Janzen, 2004).

Blanding’s turtle, *Emydoidea blandingii* (Holbrook, 1838), is an endangered semi-aquatic turtle native to North America (van Dijk & Rhodin, 2010). Around 80% of its distribution range is in the United States and 20% in Canada, where the species is divided in two designatable units (DU), defined as a “[...] geographically or genetically distinct population that may be assessed by the Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada (COSEWIC), where such units are both discrete and evolutionarily significant” (COSEWIC, 2023). The first DU is in Nova Scotia, a population genetically and spatially isolated, and the second is located in the Great-Lake and St Lawrence (GLSL) region (COSEWIC, 2016). *Emydoidea blandingii* shows in general a strong fidelity to its residence wetlands (Congdon et al., 2011; Joyal et al., 2001), but this species can travel up to 3 km on land to move to another wetland (Joyal et al., 2001; Piepgras & Lang, 2000), and up to 6 km for nesting (ECCC, 2018). Like most turtles, *E. blandingii* has a naturally low recruitment rate and therefore relies on adult survival, especially females, to ensure populations persistency (Congdon et al., 1993; ECCC, 2018).

Blanding’s turtle populations are threatened by road mortality, by predators favored by human activities, and by habitat loss over its entire range (COSEWIC, 2016; van Dijk & Rhodin, 2010). Several population genetics studies have been conducted to assess the impact of these threats on the survival and the persistence of known demographic units, and as a general pattern, genetic connectivity has declined

between populations throughout the species' distribution. At the center of its historical distribution, habitat loss and fragmentation have shaped genetic structure (Reid et al., 2017) or reinforced historic differences created by distance, post-glacial dispersion or by natural barriers such as rivers (Davy et al., 2014; Guinto et al., 2023; Sethuraman et al., 2014). In Ontario, Davy *et al.* refuted the hypothesis that the species in the GLSL DU was in panmixia, as it is divided in four distinct genetic clusters (Davy et al., 2014). However, no research on population genetics has been conducted on *E. blandingii* in Quebec, the northern limit of the species' range (COSEWIC, 2016). It is currently considered a small DU of the Great-Lake and St Lawrence population.

Our study aims to describe the genetic structure of *E. blandingii* in Outaouais, Quebec. To do so, we used already available microsatellite markers that are known to be robust and commonly used for the species (Davy et al., 2014; McCluskey et al., 2016; Mockford et al., 2005). Two hypotheses were tested: (a) *E. blandingii* in Outaouais are genetically different from Ontario, due to the Ottawa River creating a barrier to gene flow; and (b) *E. blandingii* in Outaouais represents a metapopulation, and not a single panmictic population as currently assumed (COSEWIC, 2016). In both cases, the absence of significant genetic differences between sampling locations will allow us to reject these hypotheses. In addition, the effective population sizes of *E. blandingii* in Outaouais was estimated. Our results will inform and reinforce conservation efforts and orients future management decisions for the Quebec DU.

2.3 Methods

2.3.1 Study sites

We sampled 16 wetlands in May and June of 2021, 2022 and 2023, throughout the Blanding's turtle range in Outaouais, Quebec, and three wetlands in the Ottawa Green Belt, Ontario, in May 2022 (Table 2.1). Exact locations are not shared to prevent illegal collection of this endangered species. Distance between wetlands varied between 1 and 70 km. Between 22 and 35 (average of 29) baited hoop traps were installed in each sampling location for an average of 7.61 nights. Each Blanding's turtle caught was marked with a unique identification number and scale samples were taken for genetic analyses. Capture and manipulation protocols were approved by the Animal Care Committees from the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP, CPA Faune 21-10), and by the Université du Québec en Outaouais (2022-CPA-02). SARA permits were obtained to capture and mark turtles on federal lands (Gatineau Park and Ottawa greenbelt: SARA-OR-2022-0655 and SARA-QR-2021-0598). For Quebec, scientific permits were obtained from MFFP (21-07-SF-001-GR-0, 22-07-SF-001-GR-0, and 23-07-SF-002-GR-0).

Table 2.1 Number of individuals analysed by sampling location and year captured.

Sampling locations	Province	Number of individuals analysed							
		2009	2010	2012	2014	2021	2022	2023	Total
SL 1	Qc		1			32			33
SL 2	Qc	1	4			5			10
SL 3	Qc	1	14			20			35
SL 4	Qc	21	1			78			100
SL 4.1	Qc					32			32
SL 4.2	Qc					20			20
SL 4.3	Qc					14			14
SL 4.4	Qc					5			5
SL 4.5	Qc					5			5
SL 4.6	Qc	21	1			2			24
SL 5	Qc		6			15			21
SL 6	Qc			4			11		15
SL 7	Qc		4			5			9
SL 8	Qc	1					7		8
SL 9	Qc						1		1
SL 10	Qc							1	1
SL 11	QC							1	1
SL 12	Qc							5	5
SL 13	Qc	8							8
SL 14	Qc			5					5
SL 15	Qc				1				1
SL 16	Qc	1							1
OUTAOUAIS		33	30	9	1	155	19	7	254
SL 17	On						10		10
SL 18	On						1		1
SL 19	On						1		1
ONTARIO		0	0	0	0	0	12	0	12
TOTAL		33	30	9	1	155	31	7	266

Genetic samples collected between 2009 and 2014 were also provided by the MFFP and added to the study. A single tissue sample per individual was collected throughout the sampling period. Sampling locations (SL) 4.1 to 4.6 are several interconnected wetlands in a same area. Preliminary analyses revealed no significant genetic difference between these sampling locations (data not shown), so we decided to pool these individuals into a single one named SL4. Overall, 266 individuals were analysed, distributed in 19 sampling locations (Table 2.1).

2.3.2 DNA extraction

DNA was extracted from each sample with Chelex 100 following standard protocol (Walsh et al., 1991). Twelve microsatellites were genotyped, grouped into three multiplexes (Table 2.2, Table A.1). Each multiplex was performed in 10 µL reactions: 0.5 µL of each tailed-forward primer (final concentration of 0.05 µM) (Table B.2), 0.2 µL of each reverse primer (0.2 µM), 0.1 µL of fluorescent tail for each marker in the multiplex (0.2 µM per locus), 5 µL of QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (1X), and 1 µL of DNA extract. PCR conditions were 95°C for 15 min + 40 x (94°C for 30 s, 55°C for 1 min 30 s, 72°C for 1 min) + 72°C for 1 min. GmuD70 was included even if the proportion of missing data was higher than other loci (11.88%), after preliminary tests showed it did not significantly change the results (data not shown). Then, 2 µL of PCR products were added to a mix of 8.3 µL of HI-DI formamide and 0.2 µL of LIZ-600 size standard, and sent to the *Centre d'expertise de Génome Québec* for genotyping. GeneMarker software v. 3.0.1 (SoftGenetics, 2014) was then used to analyse raw data and assign alleles. Individuals with more than 35% of missing data were removed from further analyses.

2.3.3 Statistical analysis

Genetic diversity analyses were initially done on the whole dataset and on sampling locations with at least 10 individuals (preliminary analyses using only sampling locations with at least 20 individuals showed similar patterns so we kept locations with 10 individuals to maximize the number of locations analysed), using sampling locations as *a priori* population hypotheses. Of the 19 sampling stations, seven had a minimum of ten analysed individuals (Table 2.1). Linkage-disequilibrium was tested in Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) with 10⁴ permutations while null alleles and scoring errors were identified in Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), allelic richness, observed and expected heterozygosities (H_o and H_e respectively) as well as F statistics were calculated in R with packages *hierfstat* (Goudet, 2005) and *pegas* (Paradis, 2010).

Table 2.2. Microsatellites loci used to assess *E. blandingii* genetic structure in the Outaouais metapopulation.

Locus name	Reference	Number of alleles observed	Multiplexes	Dye
BTCA2	(Libants et al., 2004)	5	3	NED
Eb09	(Osentoski et al., 2002)	8	2	FAM
Eb17	(Osentoski et al., 2002)	4	2	VIC
Eb19	(Osentoski et al., 2002)	2	1	NED
GmuA19	(King & Julian, 2004)	11	2	PET
GmuD16	(King & Julian, 2004)	12	3	VIC
GmuD21	(King & Julian, 2004)	2	1	NED
GmuD70	(King & Julian, 2004)	17	1	FAM
GmuD87	(King & Julian, 2004)	11	2	VIC
GmuD90	(King & Julian, 2004)	2	3	FAM
GmuD107	(King & Julian, 2004)	11	3	FAM
GmuD121	(King & Julian, 2004)	11	1	VIC

The next analyses were then conducted based on our two hypotheses. To test the first hypothesis that the Ottawa River is a barrier to gene flow, the whole dataset which included all 266 individuals was initially analysed in individual-based approaches to test the presence of a genetic structure. Using STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al., 2000), K-values from 1 to 15 were tested, with 10 replicates each, with a burnin of 50,000 steps followed by a run of 500,000 steps using the admixture, frequency correlated model. Structure Harvester v0.6.93 (Earl & vonHoldt, 2012) was used to select the best K value based on Evanno method's (Evanno et al., 2005). The increase in $\ln(K)$ typically plateau at the most likely value of K, except if $K=1$ is the most likely (Evanno et al., 2005). Then, for the seven sampling locations with at least ten individuals, one being in Ontario and the others in Quebec, pairwise Jost's D (Jost, 2008) were calculated in GenoDive v.3.0 (Miermans, 2020) with 10,000 permutations and the p-values were corrected with a Bonferroni correction (Rice, 1989). Jost's D values were then implemented in a Delaunay triangulation graph (Brassel & Reif, 1979) to visualise the genetic differentiation geographically. Then, an analysis of molecular variance (AMOVA) was carried out in Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) with 10^4 permutations. Sampling locations were used as *a priori* populations and provinces were used as *a priori* clusters. A Discriminant analysis of principal components (DAPC) (Jombart et al., 2010) was also conducted with R v.4.3.1 (R Core team, 2023) package *adeigenet* (Jombart, 2008) to test the genetic differentiation between individuals from Quebec and from Ontario. All 266 individuals were grouped according to their province of origin: 254 in Quebec (north of the river) and 12 in Ontario (south of the river). These were

used as *a priori* groups in the DAPC. The percentage of variance explained by the Principal component analysis (PCA) targeted was a minimum of 80%.

To test the second hypothesis that the turtles in Outaouais are not forming a panmictic population, the seven sampling locations of at least ten individuals were then analysed. Based on preliminary results, three demes were found (see results and Figure 2.1) and further analysed with pairwise Jost's D. In addition to the first AMOVA performed with the whole dataset divided in 19 populations with a separation between individuals from Quebec and Ontario, a second AMOVA testing differentiation between sampling locations of at least ten individuals, divided in the three demes, was carried out in Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) with 10^4 permutations. A second DAPC was conducted, this time using demes as *a priori* clusters to confirm their presence. The percentage of variance explained by the PCA targeted was a minimum of 80%.

Finally, the effective population size (N_e) of the Outaouais metapopulation based on the linkage disequilibrium method (Hill, 1981) was estimated with the software Ne Estimator v.2.01 (Do et al., 2014). It was then corrected to consider the adult lifespan (AL) of Blanding's turtle (>75 years (Congdon & Loben Sels, 1991)) and the age of first reproduction (FR) (average of 17.5 years (Congdon & Van Loben Sels, 1993)) using the following formula (Waples et al., 2014):

$$N_{e(adj)} = \frac{N_e}{1.103 - 0.245 * \log_{10}(\frac{AL}{FR})}$$

2.4 Results

2.4.1 Genetic variability

The whole data set and the seven sampling locations containing 10 to 100 individuals were tested for Hardy-Weinberg equilibrium. In the whole dataset, three loci departed from Hardy-Weinberg equilibrium after a Bonferroni correction for multiple comparisons: Eb09, GmuA19 and GmuD90 (Table C.1). When analysed independently, the seven sampling locations with at least 10 individuals, only one sampling locations presented a locus departing from Hardy-Weinberg equilibrium, after a Bonferroni correction: GmuD16 in SL17 (Table C.1). No sampling location had fixed alleles at analysed loci.

No consistent linkage disequilibrium was detected, with different pairs of loci showing LD in SL1 and SL4. Null alleles were detected in four loci in the complete dataset but were each associated with a different sampling location. All loci were thus kept for further analyses.

Observed heterozygosity, expected heterozygosity, allele range, allele frequencies and average allelic richness were calculated for the seven sampling locations and for the all the turtles analysed (Table 2.3 and Table D.1). Observed heterozygosity ranged from 0.600 (SL7) to 0.716 (SL2). The number of individuals per sampling location showed no significant correlation with observed heterozygosity ($P = 0.2662$) nor with the average of alleles per locus ($P = 0.0697$).

Table 2.3. Sample size, observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), allele range and average allelic richness for the seven sampling locations of Blanding's turtle with a minimum of ten individuals and for all samples combined.

	SL1	SL2	SL3	SL4	SL5	SL6	SL17	All
# individuals analysed	33	10	35	100	21	15	10	266
H_o	0.671	0.716	0.616	0.633	0.668	0.650	0.600	0.635
H_e	0.640	0.607	0.627	0.636	0.658	0.651	0.657	0.649
Allele range	2 - 9	2 - 7	2 - 10	2 - 16	2 - 10	2 - 8	2-10	2 - 17
Average allelic richness	4.351	4.147	4.455	4.426	4.720	4.407	4.844	8.199

2.4.2 Population genetics

2.4.2.1 Hypothesis 1: The Ottawa River is a barrier to gene flow between Quebec and Ontario

All 266 analysed individuals from both Quebec and Ontario formed a single genetic cluster. The complete dataset showed no signs of genetic clusters in STRUCTURE ($K = 1$, Figure E.1). While the STRUCTURE analysis did not detect any genetic structure within the region, a slight but significant differentiation was detected using pairwise Jost's D values (Table 2.4). D values ranged values ranged from 0.017 (SL5-SL17) to 0.115 (SL2-SL5). 14 of the 21 pairs had significant Jost's D after a Bonferroni correction. The lowest significant value was 0.029 (SL1-SL3). Pairwise Jost's D refuted the hypothesis that the Ottawa River is a barrier to gene flow in *E. blandingii*. Indeed, SL17, the Ontarian population, was not significantly different from four of the six Quebec sampling locations (Table 2.4). SL17 was significantly different from SL2 and SL3 (respective Jost's D of 0.086 and 0.052).

Table 2.4. Pairwise Jost's D between all sampling locations with a minimum of ten individuals. Upper diagonal is the distance in kilometers. *Indicates a value significantly different from zero, after a Bonferroni correction.

	SL1	SL2	SL3	SL4	SL5	SL6	SL17
SL1	-	5.3	11.8	22.9	23.6	29.6	55.7
SL2	0.069*	-	11.8	17.6	19.4	26.8	50.8
SL3	0.029*	0.033	-	20.8	28.0	36.4	55.6
SL4	0.052*	0.054*	0.032*	-	13.7	23.6	34.8
SL5	0.056*	0.115*	0.052*	0.031*	-	10.0	33.5
SL6	0.054*	0.088*	0.050*	0.020	0.030	-	34.7
SL17	0.045	0.086*	0.052*	0.033	0.017	0.034	-

AMOVA testing genetic differentiation between individuals from Quebec and from Ontario showed that most variation occurred within individuals (91.83%, $P < 0.001$) (

Table 2.5). Variation occurring among individuals within populations (5.78%, $P < 0.001$) and occurring among populations within clusters (2.88%, $P < 0.001$) were both significant. Variation occurring among clusters was not significant, which aligned with STRUCURE results. The DAPC results did not differ from STRUCTURE and AMOVA results. 25 principal components were retained during the PCA, as they explained 80.6% of the variance. Since only two clusters were analysed, there was only one eigenvalue. Membership probabilities were assigned to every individual and all individuals from Ontario (SL17) were assigned to other sampling location in Quebec (Table F.1).

Table 2.5. AMOVA results for testing genetic differentiation between individuals from Quebec and from Ontario. ** $P < 0.001$

Dataset	Number of individuals	Number of populations	Number of clusters	Source of variance	Variance component	Percentage of variation
All individuals	266	19	2	Among clusters	-0.0195	-0.49
				Among populations within clusters	0.1151**	2.88
				Among individuals within populations	0.2310**	5.78
				Within individuals	3.6711**	91.83

2.4.2.2 Hypothesis 2: Individuals in Outaouais do not form a single panmictic population.

As discussed in the previous hypothesis, a slight but significant differentiation between sampling location was detected using pairwise Jost's D values (Table 2.4). No sampling location was significantly different from all the other six. However, when represented with a Delaunay triangulation graph (Figure 2.1), three demes seem to form in Outaouais: SL1 in the north-west, SL2 and SL3 in the south-west, and SL4, SL5 and SL6 in the east. These demes were further analysed to confirm their presence.

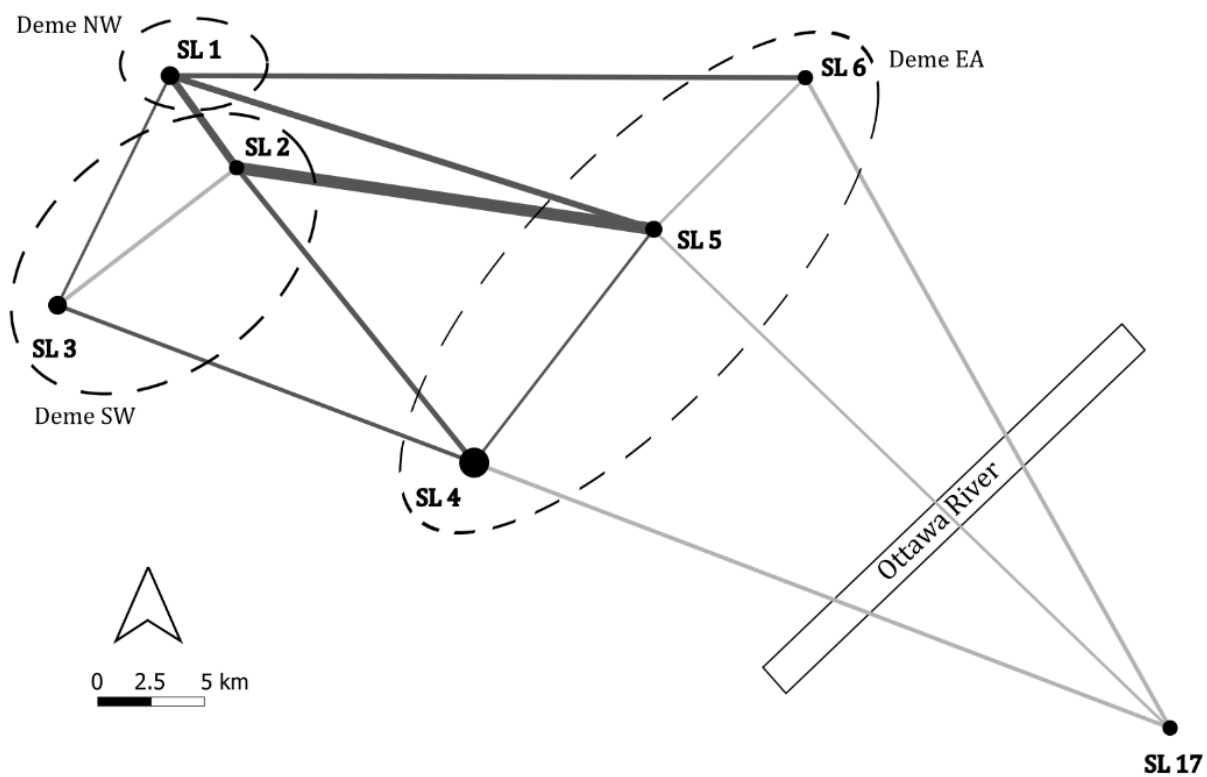


Figure 2.1. Delaunay triangulation graph of the seven sampling locations composed of at least ten individuals. Delaunay triangulation graph of the seven sampling locations composed of at least ten individuals. Location points are proportional to the sampling size and line weights are proportional to pairwise Jost's D. Black lines are significant Jost's D (after a Bonferroni correction), and grey lines are not significant. Dashed circles show the three demes. The map's background was removed to protect this endangered species.

The presence of these three demes (North-West [NW], South-West [SW] and East [EA]) with light genetic differentiation was supported by pairwise Jost's D results which showed a weak differentiation between the demes (Table 2.6). Values ranged from 0.031 (NW–SW) to 0.048 (NW–EA). All pairs had significant Jost's D after a Bonferroni correction ($P < 0.001$).

Table 2.6. Pairwise Jost's D between the demes. Upper diagonal is the p-value. *Indicate a value significantly different from zero, after a Bonferroni correction.

	NW	SW	EA
NW	-	<0.001	<0.001
SW	0.031*	-	<0.001
EA	0.048*	0.033*	-

A significant genetic differentiation among the three demes was also confirmed with an AMOVA (Table 2.7). Most variation occurred within individuals (91.89%, $P < 0.05$), but variation occurring among populations within clusters was significant, representing 1.56% ($P < 0.001$) of total variation. Variation occurring among clusters was low (0.91%, $P < 0.001$), but significant, which supported the hypothesis of three slightly differentiated demes.

Table 2.7. AMOVA results for testing genetic differentiation between sampling locations of at least ten individuals and the three demes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

Dataset	Number of individuals	Number of populations	Number of clusters	Source of variance	Variance component	Percentage of variation
Sampling locations of at least ten individuals	214	6	3	Among clusters	0.0367**	0.91
				Among populations within clusters	0.0629**	1.56
				Among individuals within populations	0.2273**	5.64
				Within individuals	3.7066*	91.89

The DAPC analysis of the seven sampling locations did not yield clear delimitations between them (Table F.1). 25 principal components were retained during the PCA, as they explained 81.6% of the variance. Three eigenvalues were retained and cumulatively explained 81.1% of inertia. Even if 63.6% of individuals had their highest assignment probability matching their location of origin (Table F.2), individuals from SL 2

and SL 6 were wrongly assigned 90% and 100% of the time respectively. However, the DAPC analysing the three demes showed that even if they were not entirely separated from each other, they only slightly overlapped (Figure 2.2). 25 principal components were retained during the PCA (Figure G.1), explaining 81.6% of the variance and two eigenvalues were retained and cumulatively explained 100% of inertia. 79.4% of individuals had a correct assignment probability matching their location of origin (Table H.1 and Table H.2).

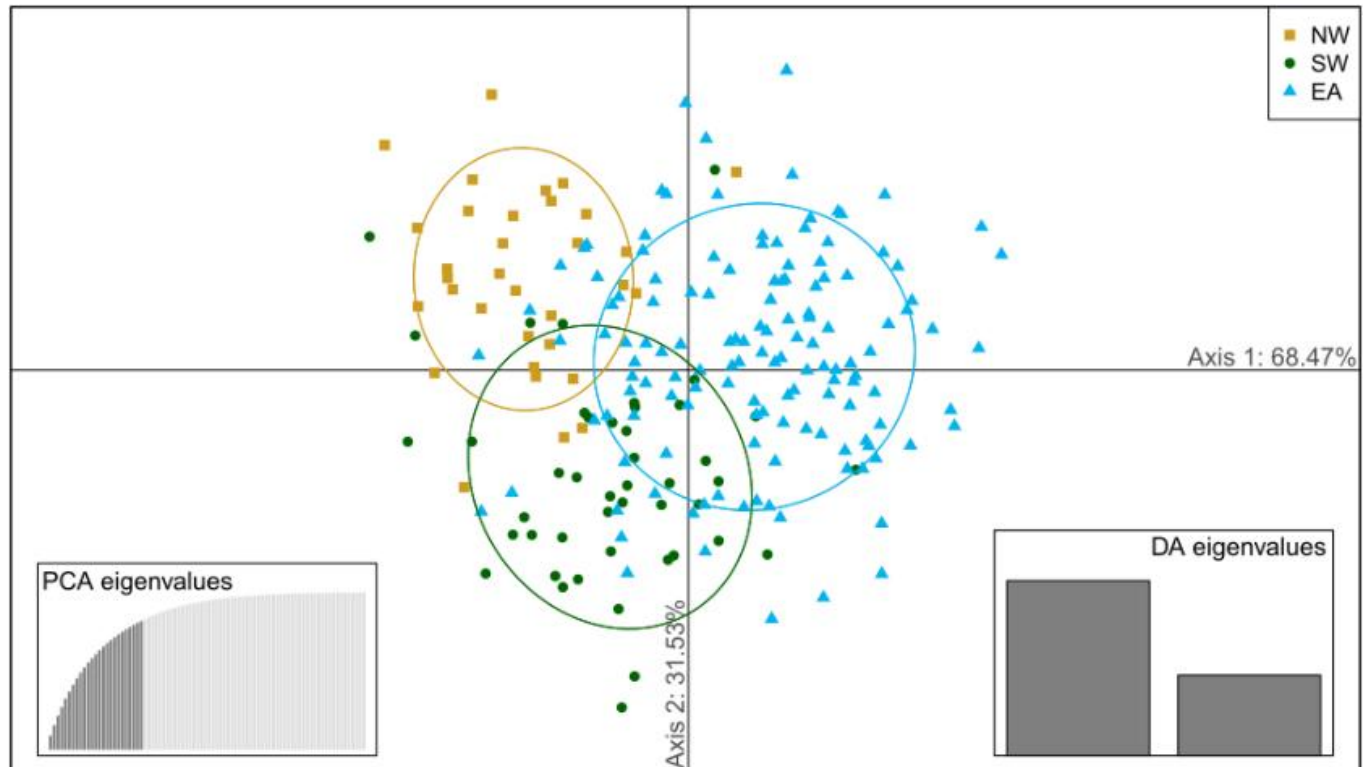


Figure 2.2. Scatter plot of all 224 individuals analysed, divided by deme of origin.

2.4.3 Effective population size

The estimation of the effective population size was done for the studied area in Outaouais and for three demes. Based on the small size of the confidence interval, the estimated N_e is robust. The mean effective population size of Outaouais' metapopulation was estimated at 156.4 (95% confidence interval [CI]: 128.6-194.2) (Table 2.8). It is lower, but within the same order of magnitude than the number of individuals in Outaouais, according to capture-mark-recapture data estimated within the same sampling locations (357.8, 95% CI: 233.5-589.3) (Désilets, 2024).

Table 2.8. Effective population size for the studied area in Outaouais. Values for lowest allele frequency of 0.02, corrected for adult lifespan and age of first reproduction. *From Désilets *et al*, 2024.

	Number of individuals captured between 2009-2023	Number of samples analysed	Mean N_e [95 % Conf. Int]	Estimated number of individuals in Outaouais*
Outaouais	292	254	156.4 [128.6 – 194.2]	357.8

The mean effective population size of the NW demes was estimated at 22.3 (95% confidence interval [CI]: 16.2-31.9), which is lower than the number of individuals captured between 2009 and 2023. For the SW and EA demes, N_e were estimated at 91.9 (95% [CI]: 57.5-192.8) and 159.4 (95% [CI]: 116.6-236.0) respectively (Table 2.9).

Table 2.9. Effective population size for the three demes. Values for lowest allele frequency of 0.02, corrected for adult lifespan and age of first reproduction.

Deme	Number of individuals captured between 2009-2023	Number of samples analysed	Mean N_e [95 % Conf. Int]
NW	46	33	22.3 [16.2 – 31.9]
SW	53	45	91.9 [57.5– 192.8]
EA	159	136	159.4 [116.6 – 236.0]

2.5 Discussion

Overall, population genetic analyses showed little structure within the Blanding’s turtle Outaouais metapopulation. Sampled individuals from Quebec were not significantly different from individuals from Ontario. A slight genetic differentiation was detected among sampling locations in Quebec, but not pronounced enough to lead to completely isolated demes.

2.5.1 Genetic variability and Population differentiation in Quebec

The population we studied is located at the northern limit of its range and we expected to find lower genetic diversity than in more central populations. Many studies investigated Blanding’s turtle genetic variability within most of its distribution range (Bassett, 2024; Davy et al., 2014; Guinto et al., 2023; McCluskey et al., 2016; Mockford et al., 2005, 2007; Reid et al., 2017). Since heterozygosity, allele range and richness we measured are similar to other populations located further south (Bassett, 2024; Davy et

al., 2014; Guinto et al., 2023; McCluskey et al., 2016; Mockford et al., 2005, 2007; Reid et al., 2017), we conclude that the Quebec metapopulation does not show evident signs of genetic variability loss.

Our first research hypothesis was that the *E. blandingii* metapopulation in Outaouais is genetically different from Ontario and that this difference is due to the Ottawa River creating a barrier to gene flow, since this species prefers shallow wetlands to rivers and other lotic habitats (Edge et al., 2010; Ernst & Lovich, 2009; Rowe, 1987; St-Hilaire, 2003). In fact, Blanding's turtle uses wetlands for feeding, breeding and hibernating (Edge et al., 2010; Rowe, 1987; St-Hilaire, 2003) and open terrestrial habitat such as beaches, fields, roadsides and sand pits for nesting (Beaudry et al., 2009; Joyal et al., 2001; Rowe & Moll, 1991). It uses both wetlands and forests for thermoregulation, movement and estivation (Beaudry et al., 2009; Joyal et al., 2001; Rowe & Moll, 1991). In our study, there was no evidence of genetic differentiation between individuals from Quebec and Ontario. First, no sign of different genetic clusters linked to geographic origin was found in the Bayesian clustering method nor in the DAPC. Second, the variations occurring among provinces in the AMOVAs were not significant. Finally, the pairwise Jost's D showed that the Ontarian sampling location was not significantly different from four of the Quebec sampling locations.

In general, rivers have been documented to either facilitate or impede gene flow in freshwater turtles. Indeed, for *Dermatemys mawii* Gray, 1847, rivers are essential components of populations connectivity and gene flow (González-Porter et al., 2013), whereas for *Glyptemys insculpta* (Le Conte, 1830) in Quebec, the St. Lawrence River acts as a genetic barrier (Tessier et al., 2005). For *E. blandingii*, some rivers were reported to be a barrier, and others not. For example, significant genetic differences were found between two populations on separate sides of the Mississippi River (Sethuraman et al., 2014) ($F_{ST} = 0.2867$, separated by 59 km). The Hudson River is also considered a barrier to gene flow, with genetically different populations on each of its sides ($F_{ST} = 0.233$) (Mockford et al., 2007). The St. Lawrence River, however, seems to facilitate gene flow in three populations for *E. blandingii* distributed on both sides. In this case, genetic differentiation was either not significant ($F_{ST} = 0.010$, separated by 75 km) or significant but low ($F_{ST} = 0.070$, separated by 34 km). These three populations also belonged to the same cluster in a Bayesian clustering method (McCluskey et al., 2016). Therefore, our results align with those of McCluskey *et al.* (2016), suggesting that the Ottawa river, like the St Lawrence River, is not a barrier to gene flow for Blanding's turtles.

However, since only ten individuals from Ontario were analysed, a delimitation might be found with a larger Ontarian sample, or with more balanced sample sizes. Indeed, since Blanding's turtles were only caught in three Ontarian sampling locations, SL17 containing 10 of the 12 individuals caught in this province, the sample sizes were skewed in favor of Quebec. In performed analysis, either only one sampling location of 10 individuals represented Ontario, or three sampling locations were included but two only had one turtle each. Results must thus be considered with caution. Other approaches, such as genotyping by sequencing methods, could provide a finer resolution than microsatellites to uncover subtle structures (Hohenlohe et al., 2021). Nevertheless, our results advocate for the coordination of management and conservation efforts between the two provinces. Since turtles seem to be able to cross the Ottawa river, an example of collaborative management initiative could be to share identification numbers to avoid repetitions and to identify the turtles moving between the provinces.

The second objective of our study was to test if *E. blandingii* in Outaouais represents a single panmictic population or a network of demes with variable levels of genetic connections. In our study, significant pairwise Jost's D values between Quebec sampling locations varied from 0.029 to 0.115, which is comparable to other Blanding's turtle studies within the same geographic scale (Guinto et al., 2023; Mockford et al., 2005). These values are also comparable to populations with three times the geographic distance between them (Davy et al., 2014). In addition, results from AMOVA analysis showed that 1.64% to 2.88% of the variance was significantly explained by the sampling locations, which is similar to a study conducted in the eastern Great Lakes (Bassett, 2024). Therefore, the results from pairwise Jost's D, from the AMOVAs and from the DAPC all support the hypothesis that some genetic differentiation exist between the sampling locations in Blanding's turtles of Outaouais.

This hypothesis of genetic structuring is based on the impact human activities may have had on *E. blandingii* genetic connectivity in the area over the last centuries. Indeed, in Quebec, the two most important threats for this species are road mortality and loss of habitat due to drainage for agriculture or due to beaver dam dismantling (ECCC, 2018; ÉRTQ, 2020). Habitat fragmentation, roads and other human landscape features are known to influence turtle's distribution, abundance and survival (Auge et al., 2024; Marchand & Litvaitis, 2004), notably in *E. blandingii*, which is most likely to be found in wetlands surrounded by forests and undisturbed lands (Fyson & Blouin-Demers, 2021). The COSEWIC estimates that the Great Lakes and St-Lawrence population of Blanding's turtle lost more than 60% of its mature individuals due to habitat loss and will lose more than 50% of its current numbers solely due to road

mortality in the next three generations. The region where *E. blandingii* has been found in Quebec has been colonised since at least 1795, with villages well established by the early 19th century (protected data available upon request). While the proportion of wetland loss on the Quebec side has not been estimated (COSEWIC, 2016), the Ontarian counties just south of the Ottawa River lost 61 to 71% of their wetlands since the 1800s (Ducks Unlimited Canada, 2010). As there is no apparent reason this would be significantly different in Quebec, habitat loss may have impacted gene flow and lead to various levels of genetic isolation between demes (Jackson & Fahrig, 2016; Pflüger et al., 2019; Reid et al., 2017). This has been illustrated notably in mammals (Lino et al., 2019) and turtles (Gallego - García et al., 2019; Reid et al., 2017). In the studied region, human disturbances started 200 years ago but fragmentation by major roads is much more recent. Blanding's turtles can live as long as 75 years, and its generation time is estimated to be close to 37 years (Congdon et al., 1993). Thus, habitat fragmentation started less than six generations ago and intensified during the last generation. Based on empirical and theoretical work (Guinto et al., 2023; Kuo & Janzen, 2004; Marsack & Swanson, 2009; Reid et al., 2017), the fact that we see a weak differentiation despite the beginning of habitat loss being recent leads to the expectation that differentiation could increase in the future. However, this differentiation observed could stem from a sampling artifact. Indeed, its long generation time and overlapping generations imply that a long lag between gene flow restrictions and allele frequency changes exists, in other words, that genetic differentiation is slow to develop (Alacs et al., 2007; Kuo & Janzen, 2004). Since human colonisation occurred less than 10 generations ago, allele frequencies changes are unlikely to be detected using microsatellites. Even the changes that occurred in the ~200 generations since Holocene Climate Optimum (Summerhayes & Charman, 2015), the retreat of the Champlain Sea (LaRoche & Plourde, 2017) and the start of the northward colonisation by *Emydoidea blandingii* might have left little traces (Postaire et al., 2024). Furthermore, species with similar life traits are generally less sensitive to genetic drift and genetic diversity loss, with seemingly high genetic diversity hiding recent population bottlenecks and effects of recent habitat modifications (Guinto et al., 2023; Kuo & Janzen, 2004; Marsack & Swanson, 2009). Other studies on *E. blandingii* population in Ontario and other long-lived turtles found patterns congruent with these theoretical expectations: although populations were situated in highly fragmented landscapes with no evidence of current migration, genetic analyses revealed little to no genetic differentiations even with strong populations decline (Davy et al., 2014; Davy & Murphy, 2014; Marsack & Swanson, 2009). Our results differ from previous studies, as we can reject the hypothesis that *E. blandingii* forming a single panmictic population in Quebec. The fact that we can detect some genetic differentiation at a small sampling scale might mean that the landscape fragmentation has a stronger impact on these populations

that anticipated (Alacs et al., 2007; Kuo & Janzen, 2004) and the principle of precaution suggest that actions to limit the risks of genetic diversity loss should be taken (Whelan et al., 2004). One way to confirm the existence of observed genetic differentiation would be to use genomic data, and realise a detailed modelling of its N_e historical trajectory and the timing of divergence between demes (Lesturgie et al., 2022).

2.5.2 Future of populations

With the threats of road mortality, habitat loss and predation, we wanted to evaluate the effective population size of Blanding's turtle in Outaouais, since no estimation has been published in this area (COSEWIC, 2016; ÉRTQ, 2020). In this study, the effective population size (N_e) in Outaouais is estimated at less than 200 individuals, which is close to the number of individuals analysed. In the NW, SW and EA demes, values of N_e were 22.3, 91.9 and 159.4 respectively, two of which were higher than the number of individuals captured and analysed. Recently, a capture-mark-recapture study conducted in the same study sites estimated that there are around 400 individuals (between 263 and 590 individuals) in the sampled area (Désilets, 2024). Usually, values of N_e are about one order of magnitude less than the population size (Frankham, 1995b), which is not the case here. Indeed, our results are more similar to theoretical simulation of species with long overlapping generation, polyandry and polygyny, where the effective population size tends towards half of the census size (Nunney, 1993). They also compare to other Blanding's turtle studies where N_e values were close to or greater than the number of sampled individuals (Bassett, 2024; Guinto et al., 2023; McCluskey et al., 2016). It is important to note that the age of first reproduction chosen to correct the effective population size was the one observed by Congdon and van Loben Sells in Michigan, as this data has not been established in Quebec. It is likely, however that the age of first reproduction at the northern edge of the species' distribution resemble the one in Nova Scotia, of 20 to 25 years old (Lefebvre et al., 2011; Mockford et al., 2005), which lower the estimate marginally (Table I.1). In other turtle species, the N_e/N_c ratio tends to vary greatly, from very low (ratio of 0.1 or less) (Chassin-Noria et al., 2004; Holland Stephens, 2003) to greater than 1 (Dutton et al., 1999; Spradling et al., 2010). Values of effective population and census size found in Outaouais are similar to other studies in other parts of the distribution of the species and have direct implication for conservation: every adult loss represent a potential loss of genetic information (Guinto et al., 2023), a threat exacerbated by the threat road mortality poses to gravid females.

Indeed, rapidly declining populations can undergo demographic bottlenecks, which can lead to genetic bottlenecks. Documenting the former requires long-term monitoring of population parameters, such as

abundance, survival and recruitment, often coupled with historic data like changes in the range of the species (Bonebrake et al., 2010; Schwartz et al., 2007). The latter, on the other hand, can be detected with a single population sample, with methods seeking deviations from expected mutation-drift equilibrium (Cornuet & Luikart, 1996; Peery et al., 2012; Tajima, 1989). However, several studies have shown that recent genetic bottlenecks are detectable only in certain conditions with the current available methods (Díez-del-Molino et al., 2018; Kuo & Janzen, 2004; Peery et al., 2012; Postaire et al., 2024), specially in long-lived species with overlapping generations (Davy & Murphy, 2014; Marsack & Swanson, 2009). Newer analyses, such as high-resolution analysis of linkage disequilibrium, could detect recent bottlenecks, but need a large number of genomic markers (Santiago et al., 2020). The effects of both bottlenecks have consequences on multiples generations, even after population regrowth (Grossen et al., 2020). In fact, small, declining populations face higher risks of inbreeding depression, of genetic drift and of deleterious mutations accumulation, all leading towards reduced fitness and evolutionary potential (Alacs et al., 2007; Bouzat et al., 1998; Grossen et al., 2020; Hohenlohe et al., 2021; Nei et al., 1975).

The Outaouais population has many factors that could cause a demographic bottleneck, but we currently do not have the data to confirm it. If a demographic bottleneck is indeed occurring, it could have consequences on the metapopulation's genetic health, and it would be imperative to use the most recent methods to detect them as soon as possible. Appropriate conservation measures will be influenced by the presence of demographic and/or genetic bottlenecks.

Even if the Blanding's turtle metapopulation of Outaouais does not yet show signs of genetic diversity loss, the genetic differentiation observed in the area suggests that we might observe such a loss in the future. Also, since the effective population size is close to the census size, the species recruitment might be at risk which would further decrease the genetic diversity, especially if road mortality is not reduced. Hence, enhanced protection and management efforts are required to ensure its persistence, even with permanent habitat protection (Browne & Hecnar, 2007; Glowacki & Kuhns, 2010). First, identifying and protecting the most vital and viable demes in Outaouais is crucial to ensure that conservation measures are applied efficiently (King, 2023). Large and stable demes should be prioritized as they are more resilient (King, 2023) and could serve as reservoirs to reinforce smaller demes with low growth rates (Guinto et al., 2023; Kuo & Janzen, 2004). Second, creating and maintaining ecological corridors between essential habitats is key to prevent further fragmentation and population differentiation (Auge et al., 2024; Phalan et al., 2018). Third, maintaining buffer zones around essential habitats (*e.g.*, forest cover around wetlands

(Fyson & Blouin-Demers, 2021)) and installing roadside mortality mitigation infrastructures, (*i.e.*, ecopassages with fences (Read & Thompson, 2021)), will also improve connectivity between wetlands. Combined with these measures, a long-term demographic and genetic monitoring study is needed to better estimate the viability of this population.

CHAPITRE 3

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ce projet avait pour but de déterminer la structure génétique des tortues mouchetées (*Emydoidea blandingii*) en Outaouais en évaluant la connectivité et la diversité génétique. Grâce à plusieurs saisons d'échantillonnage sur le terrain, à de nombreuses manipulations en laboratoire ainsi qu'à une analyse statistique approfondie, l'objectif a été atteint.

La génétique des populations est un aspect important de la conservation particulièrement chez les espèces menacées, puisqu'elle permet d'obtenir de l'information sur la viabilité des populations, sur leur résilience ainsi que sur leur potentiel d'adaptation. Dans le cas de la tortue mouchetée, il est connu que ces populations sont plus ou moins connectées génétiquement à travers son aire de répartition, notamment en raison de la fragmentation du paysage. Au Québec, aucune étude génétique n'avait été effectuée sur les individus de l'Outaouais avant ce projet.

Deux hypothèses ont été testées afin d'élucider l'état de la connectivité et de la structure génétique chez les tortues mouchetées de l'Outaouais. La première postulait que les ces tortues étaient génétiquement différentes de celles de l'Ontario, la rivière des Outaouais étant une barrière infranchissable limitant les flux de gènes. La seconde postulait que les tortues mouchetées de l'Outaouais représentaient une métapopulation et non une population panmictique unique comme précédemment assumé.

Pour atteindre l'objectif posé, seize milieux humides du Québec et trois milieux humides de l'Ontario ont été visités lors des étés 2021 , 2022 et 2023. Un échantillon d'écailles a été prélevé sur chaque tortue mouchetée capturée avant d'être analysé en laboratoire avec douze microsatellites. Au total, 266 individus ont été analysés pour ce projet : 254 provenant de l'Outaouais et 12 de l'Ontario. Des indices de variabilité génétique tels que la richesse allélique et l'hétérozygotie ont d'abords été calculés. Ensuite, la première hypothèse a été testée avec une analyse de groupe Bayésien, une AMOVA, une DAPC, ainsi qu'une analyse des D de Jost par paires de populations. Puis, une AMOVA, deux DAPC, ainsi que deux analyse des D de Jost par paires de populations ont été répétées pour la deuxième hypothèse, cette fois avec seulement les individus du Québec. Finalement, la taille efficace de la population de l'Outaouais a été estimée.

Parmi tous les résultats obtenus, trois retiennent l'attention. Premièrement, il n'y avait pas de différences génétiques significatives entre les individus du Québec et de l'Ontario échantillonnés, contrairement à l'hypothèse initiale. Cela suggère que la rivière des Outaouais n'est pas une barrière complète aux flux de gènes. Deuxièmement, trois dèmes avec une légère différenciation génétique ont été identifiés dans la métapopulation de l'Outaouais. Les individus du Québec ne forment donc pas une population panmictique; il est possible d'en déduire que les effets de la fragmentation du paysage sont plus importants qu'attendus. Troisièmement, la taille efficace de la métapopulation de l'Outaouais a été estimée à moins de 200 individus, ce qui est dans le même ordre de grandeur que la taille réelle estimée. La perte d'un adulte représente une perte potentielle d'informations génétiques, une menace exacerbée par la risque que pose la mortalité routière sur les femelles gravides.

Comme toutes études, ce projet comporte des limites. Tout d'abord, la taille des échantillons est disproportionnée en faveur du Québec. Des efforts de capture ont été mis dans cinq milieux humides ontariens, mais des tortues mouchetées n'ont été capturées que d'en trois d'entre eux, dont 10 des 12 individus dans un même milieu humide. Malgré ces efforts, le nombre d'individus en Ontario est demeuré limité. De plus, malgré un effort d'échantillonnage comparable dans les milieux humides québécois visités, plusieurs contenaient moins de dix tortues et n'ont pas pu être inclus dans les analyses centrées sur les populations. Refaire les analyses avec des tailles d'échantillons plus balancées ou avec une autre approche génomique, telle que le génotypage par séquençage, pourraient apporter une résolution plus fine et faire émerger les structures plus subtiles. Enfin, les résultats obtenus reflètent l'état de la connectivité d'il y a une quinzaine d'années, soit l'âge estimé de la plus jeune tortue mouchetée analysée. Effectivement, l'effet de la fragmentation plus récente est caché par la longévité de la tortue mouchetée et par son âge de maturité tardif, ainsi que par le manque de jeunes capturés. Pour avoir un état actuel de la connectivité et de la viabilité des dèmes, un projet permettant de trouver les jeunes tortues et d'en analyser la génétique serait essentiel.

En conclusion, comme la métapopulation des tortues mouchetées de l'Outaouais démontre une différenciation génétique au sein de ses dèmes, que la taille efficace de la métapopulation est proche de la taille réelle estimée et qu'aucun jeune n'a été capturé, la diversité génétique et le recrutement de l'espèce en Outaouais pourrait être en péril. Le principe de précaution invite à prendre action afin de limiter ces risques. Une protection accrue et des efforts de gestion supplémentaires sont requis pour assurer sa persistance, même avec une protection permanente de l'habitat (Browne & Hecnar, 2007).

Premièrement, identifier et protéger les dèmes cruciaux les plus viables en Outaouais est essentiel pour assurer que les mesures de conservation soient appliquées de façon efficace (King, 2023). Les dèmes larges et stables devraient être priorisés, puisque plus résilients (King, 2023), et pourraient servir de réservoir pour renforcer les dèmes plus petits ou ayant des taux de recrutement plus faibles (Guinto et al., 2023; Kuo & Janzen, 2004). Deuxièmement, créer et maintenir les corridors écologiques entre les habitats essentiels de la tortue mouchetée est nécessaire pour prévenir une fragmentation supplémentaire et une augmentation de la différenciation génétique (Auge et al., 2024; Phalan et al., 2018). Troisièmement, maintenir des zones tampons autour des habitats essentiels (par exemple, un couvert forestier autour des milieux humides (Fyson & Blouin-Demers, 2021)) et installer des infrastructures d'atténuation de mortalité routière (par exemple, des ecopassages avec des clôtures (Read & Thompson, 2021)) permettra de maintenir la connectivité entre les milieux humides. Quatrièmement, une coordination de la gestion et des efforts de conservation entre le Québec et l'Ontario doit être mise en place. Comme les tortues semblent pouvoir traverser la rivière des Outaouais, un exemple de gestion collaborative serait de partager les numéros d'identification afin d'éviter les répétitions et d'identifier les tortues migrant entre les provinces. Notre étude suggère aussi que la translocation d'individus entre province est possible si un renforcement de population est nécessaire, bien que cela devrait être confirmé avec un jeu de données plus imposant. Finalement, une étude du recrutement de la métapopulation permettant de trouver les jeunes et de tester leur génétique permettrait d'avoir un portrait actuel de la connectivité et de la viabilité de la tortue mouchetée en Outaouais. Combiné avec toutes ces mesures, un suivi démographique et génétique à long terme est nécessaire pour mieux estimer la viabilité de cette espèce en Outaouais et pour assurer des mesures de conservation efficaces.

ANNEXE A

Microsatellite sequences

Table A.1. Microsatellite sequences

Locus name	Primer sequence (5'-3')	Repeat structure	Reference
BTCA2	1- CTT AAA AAG ACA TTA AAA TAT CTT 2- AAC TCT CCC TAA AAC CAC AG	(CA) ₈ N ₁₄ (CA) ₇	(Libants et al., 2004)
Eb09	1- TTG AAT TAG CTC ATA AGC AC 2- TCA TAA TGT GAA TTG GTC TC	CA	(Osentoski et al., 2002)
Eb17	1- CCC ACA AAA GTA GAC ACC TAT 2- GGC ACT GAA ATA AGA GAA AGT A	AAT	(Osentoski et al., 2002)
Eb19	1- AGG GCT CTG AAG CAC TAA AGT AA 2- CTC CGG CTT TTC ATT TGT GT	AAT	(Osentoski et al., 2002)
GmuA19	1: TAA GAG ACA GAT GCT CAG CAA G 2: GTA CAT AAC ACG CAC CCA ATG	(GA) ₇ (GT) ₁₄	(King & Julian, 2004)
GmuD16	1: ATC CCT GAA ATT TTG TGT GTT C 2: TTT ACT CTA GAA GGG GCA ATC C	(ATCT) ₁₉	(King & Julian, 2004)
GmuD21	1: GCA GTT AGG CAT TAC TCA ACA TC 2: AGG GTA TGA ATA CAG GGG TGT C	(ATCT) ₁₅	(King & Julian, 2004)
GmuD70	1: AGT GTA GTC ATG GCA TAG AGA GG 2: ATC AAA TTC TTC CAA CCC TAC C	(ATCT) ₈	(King & Julian, 2004)
GmuD87	1: AAA CCC TAA GAC ATC AGA CAG G 2: CAA ATC CAG TAC CCA GAA AGT C	(ATCT) ₂₂	(King & Julian, 2004)
GmuD90	1: ATA GCA GGA CAA TTA CCA CCA G 2: CCT AGT TGC TGC TGA CTC CAC	(ATCT) ₉	(King & Julian, 2004)
GmuD107	1: GAC AAA CAT GAA CAG GAG AAG AG 2: ATT AGA GAG ACA GAT AGA TAG GAC TTG	(ATCT) ₁₅	(King & Julian, 2004)
GmuD121	1: GGC AAA TAT CCA ATA GAA ATC C 2: CAA CTT CCT CGT GGG TTC AG	(ATCT) ₈	(King & Julian, 2004)

ANNEXE B
Tail sequences

Table B.2. Tail sequences

Tail name	Primer sequence (5'-3')	Associated dye	Reference
Bhg-r	TAGAAGGCACAGTCGAGG	PET	(SignaGen, 2016)
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	FAM	(SignaGen, 2016)
M13R-pUC	CAGGAAACAGCTATGAC	NED	(SignaGen, 2016)
p19bs	GCCGCTCTAGAACTAGTG	VIC	(Schuelke, 2000)

ANNEXE C

Chi2 test values for Hardy-Weinberg equilibrium

Table C.1. Chi² test values for Hardy-Weinberg equilibrium for the whole dataset and by population. Values in red are significant after a Bonferroni correction.

Locus	Whole dataset			SL 1			SL 2			SL 3		
	chi ²	df	P exact	chi ²	df	P exact	chi ²	df	P exact	chi ²	df	P exact
Eb19	0.18E-01	1	0.711	2.96E-01	1	0.717	2.90E+00	1	0.223	3.27E-01	1	0.747
GmuD21	7.80E-02	1	0.844	1.17E+00	1	0.642	1.11E+00	1	1.000	7.65E-01	1	0.378
GmuD70	3.60E+02	136	0.754	1.72E+01	21	0.826	1.09E+01	15	0.968	2.90E+01	36	0.317
GmuD121	6.74E+01	66	0.053	4.11E+01	28	0.026	2.92E+01	21	0.753	3.30E+01	36	0.543
Eb09	1.11E+02	28	0	1.44E+01	10	0.150	6.25E-01	6	1.000	1.40E+01	15	0.358
Eb17	9.20E+00	6	0.135	9.07E+00	6	0.137	6.20E+00	3	0.141	4.62E+00	3	0.156
GmuA19	1.47E+02	55	0	1.77E+01	21	0.680	1.33E+01	15	0.357	1.81E+01	21	0.623
GmuD87	6.47E+01	66	0.491	9.33E+00	10	0.594	6.05E+00	10	0.602	2.65E+01	36	0.252
BTCA2	7.68E+00	10	0.611	3.96E+00	6	0.653	2.92E+00	3	0.837	8.39E+00	10	0.255
GmuD16	1.10E+02	78	0.368	5.59E+00	10	0.915	6.26E+00	6	0.344	4.15E+01	28	0.089
GmuD90	8.76E+00	1	0.004	3.89E-01	1	0.697	6.25E-01	1	1.000	6.24E-04	1	1.000
GmuD107	4.28E+01	55	0.847	2.96E+01	36	0.891	9.38E+00	15	1.000	3.47E+01	36	0.403
Locus	SL 4			SL 5			SL 6			SL 17		
	chi ²	df	P exact	chi ²	df	P exact	chi ²	df	P exact	chi ²	df	P exact
Eb19	9.49E-02	1	0.842	1.07E-01	1	1.000	3.24E-02	1	1.000	1.11E+00	1	1.000
GmuD21	4.52E-01	1	0.764	2.33E-01	1	1.000	1.52E+00	1	0.204	6.08E+00	1	0.023
GmuD70	1.88E+02	120	0.034	3.08E+01	45	0.684	6.60E+00	10	0.751	4.11E+01	21	0.122
GmuD121	3.50E+01	28	0.105	3.35E+01	36	0.377	2.06E+01	21	0.753	3.07E+01	45	0.971
Eb09	1.18E+01	6	0.047	2.23E+01	21	0.042	1.56E+01	15	0.375	9.01E+00	10	0.616
Eb17	4.29E+00	6	0.481	2.93E+00	6	0.742	7.00E+00	3	0.051	2.85E-01	3	1.000
GmuA19	7.91E+01	45	0.006	6.64E+01	36	0.010	2.37E+01	21	0.024	1.85E+01	15	0.287
GmuD87	9.48E+00	15	0.440	1.13E+01	15	0.543	4.33E+00	6	0.670	2.87E+00	3	0.623
BTCA2	1.26E+01	6	0.073	1.19E+01	6	0.056	8.10E+00	6	0.397	2.96E+00	6	0.923
GmuD16	1.48E+02	66	0.382	3.73E+01	36	0.078	4.26E+01	28	0.403	5.47E+01	21	0.000
GmuD90	1.84E+00	1	0.252	2.55E+00	1	0.176	2.76E+00	1	0.255	6.25E-01	1	1.000
GmuD107	4.69E+01	55	0.579	3.44E+01	36	0.411	2.65E+01	21	0.197	2.79E+01	36	1.000

ANNEXE D
Allelic frequencies

Table D.1. Allelic frequencies for the sampling locations with at least 10 individuals. All_W: weighted by sample size. All_NW: non-weighted

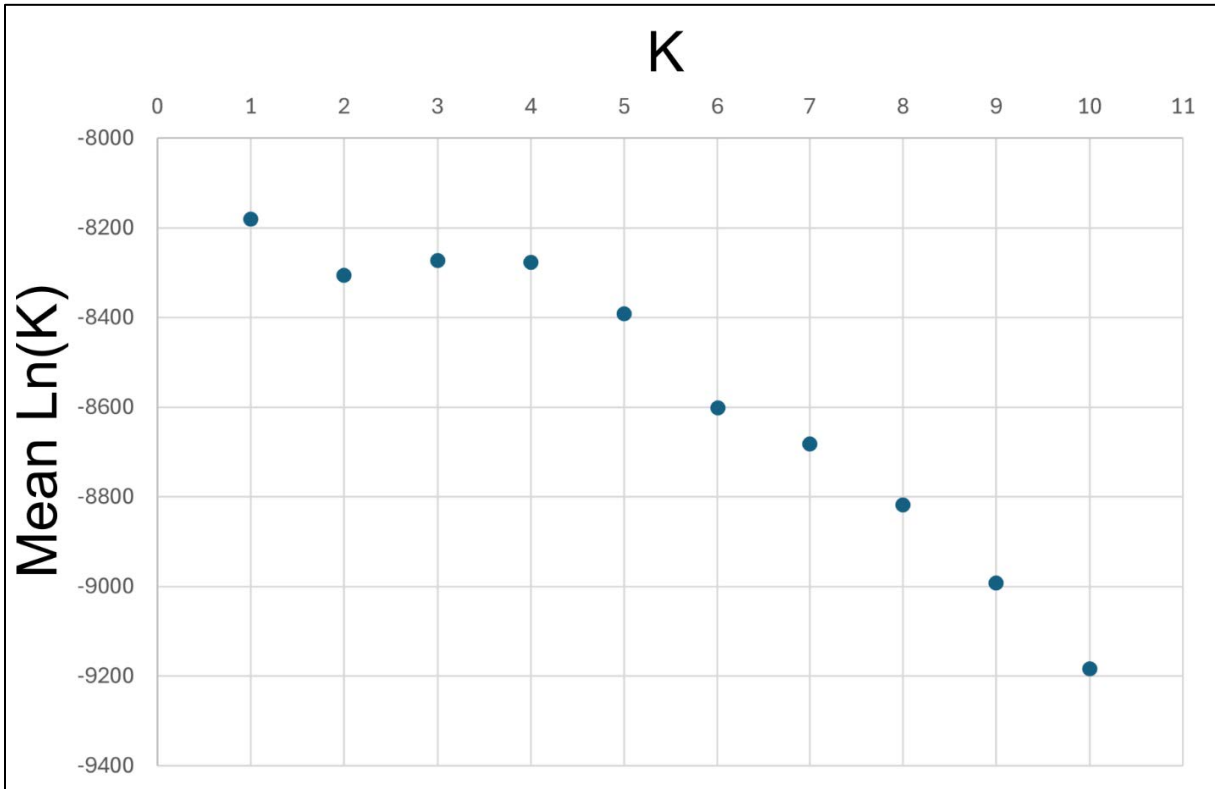
Locus	Allele	SL1	SL2	SL3	SL4	SL5	SL6	SL17	All_W	All_NW
BTCA2	198	0.061	0.333	0.014	0.099	0.026	0.133	0.050	0.083	0.102
	200	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.008
	202	0.561	0.389	0.586	0.464	0.500	0.700	0.350	0.509	0.507
	204	0.318	0.000	0.171	0.260	0.211	0.033	0.200	0.221	0.171
	206	0.061	0.278	0.171	0.177	0.263	0.133	0.400	0.177	0.212
Eb09	150	0.000	0.050	0.029	0.122	0.190	0.033	0.150	0.088	0.082
	158	0.000	0.000	0.014	0.000	0.024	0.133	0.200	0.023	0.053
	160	0.125	0.050	0.086	0.092	0.190	0.133	0.050	0.104	0.104
	164	0.500	0.800	0.700	0.719	0.333	0.500	0.450	0.624	0.572
	166	0.125	0.000	0.014	0.000	0.024	0.000	0.000	0.023	0.023
	170	0.016	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.005	0.006
	173	0.234	0.100	0.157	0.066	0.214	0.167	0.150	0.131	0.156
	177	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.002	0.005
Eb17	118	0.258	0.200	0.265	0.196	0.119	0.267	0.100	0.209	0.201
	121	0.485	0.550	0.574	0.546	0.548	0.333	0.550	0.527	0.512
	124	0.227	0.250	0.162	0.237	0.310	0.400	0.350	0.248	0.277
	127	0.030	0.000	0.000	0.021	0.024	0.000	0.000	0.016	0.011
Eb_19	116	0.621	0.350	0.586	0.572	0.667	0.600	0.750	0.590	0.592
	122	0.379	0.650	0.414	0.428	0.333	0.400	0.250	0.410	0.408
GmuA19	153	0.000	0.050	0.000	0.026	0.048	0.000	0.100	0.023	0.032
	156	0.000	0.000	0.015	0.026	0.000	0.143	0.000	0.023	0.026
	161	0.050	0.000	0.000	0.021	0.024	0.000	0.150	0.025	0.035
	163	0.150	0.050	0.147	0.227	0.286	0.214	0.100	0.194	0.168
	167	0.483	0.600	0.456	0.247	0.214	0.250	0.400	0.333	0.379
	169	0.100	0.150	0.132	0.284	0.167	0.250	0.000	0.201	0.155
	171	0.083	0.050	0.118	0.072	0.143	0.036	0.100	0.086	0.086
	173	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.002	0.003
	176	0.067	0.100	0.103	0.031	0.048	0.036	0.150	0.058	0.076
	178	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.002	0.001
	180	0.067	0.000	0.029	0.062	0.048	0.071	0.000	0.051	0.040

Locus	Allele	SL1	SL2	SL3	SL4	SL5	SL6	SL17	All_W	All_NW
GmuD16	173	0.152	0.100	0.044	0.085	0.214	0.000	0.000	0.092	0.085
	177	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.004	0.001
	178	0.000	0.000	0.044	0.005	0.000	0.100	0.000	0.016	0.021
	182	0.061	0.050	0.103	0.130	0.119	0.000	0.250	0.108	0.102
	186	0.621	0.600	0.397	0.455	0.310	0.467	0.450	0.464	0.471
	189	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.002	0.007
	190	0.000	0.000	0.088	0.030	0.119	0.167	0.000	0.049	0.058
	194	0.000	0.000	0.000	0.050	0.024	0.000	0.050	0.027	0.018
	198	0.000	0.150	0.074	0.085	0.048	0.133	0.050	0.072	0.077
	202	0.076	0.100	0.118	0.080	0.095	0.033	0.100	0.085	0.086
	206	0.000	0.000	0.132	0.020	0.048	0.033	0.050	0.038	0.040
	210	0.091	0.000	0.000	0.040	0.024	0.033	0.000	0.036	0.027
	214	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.033	0.000	0.007	0.006
GmuD21	166	0.258	0.250	0.118	0.200	0.095	0.267	0.350	0.200	0.220
	170	0.742	0.750	0.882	0.800	0.905	0.733	0.650	0.800	0.780
GmuD70	229	0.000	0.000	0.000	0.046	0.000	0.000	0.000	0.020	0.007
	233	0.172	0.167	0.167	0.138	0.024	0.227	0.050	0.138	0.135
	234	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.005	0.002
	241	0.156	0.000	0.121	0.029	0.095	0.091	0.000	0.071	0.070
	245	0.172	0.167	0.212	0.437	0.381	0.455	0.600	0.350	0.346
	249	0.234	0.278	0.197	0.144	0.119	0.045	0.100	0.163	0.160
	257	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.002	0.001
	269	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.050	0.010	0.010
	272	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.002	0.003
	273	0.078	0.278	0.197	0.115	0.167	0.136	0.000	0.131	0.139
	277	0.000	0.000	0.015	0.011	0.000	0.045	0.100	0.015	0.025
	285	0.094	0.000	0.045	0.011	0.000	0.000	0.000	0.027	0.022
	289	0.000	0.000	0.015	0.006	0.024	0.000	0.000	0.007	0.006
	293	0.000	0.056	0.000	0.006	0.024	0.000	0.000	0.007	0.012
	296	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.002	0.001
	301	0.094	0.056	0.030	0.006	0.048	0.000	0.050	0.032	0.040
	304	0.000	0.000	0.000	0.011	0.095	0.000	0.050	0.017	0.022

Locus	Allele	SL1	SL2	SL3	SL4	SL5	SL6	SL17	All_W	All_NW
GmuD87	209	0.591	0.350	0.486	0.435	0.452	0.433	0.550	0.469	0.471
	213	0.152	0.450	0.229	0.315	0.357	0.200	0.300	0.279	0.286
	218	0.152	0.050	0.057	0.210	0.119	0.333	0.150	0.167	0.153
	221	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.010
	222	0.015	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.004
	229	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.002	0.003
	234	0.091	0.100	0.014	0.020	0.024	0.033	0.000	0.033	0.040
	237	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.007
	262	0.000	0.000	0.029	0.010	0.000	0.000	0.000	0.009	0.006
	266	0.000	0.000	0.071	0.010	0.024	0.000	0.000	0.018	0.015
	270	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.004
GmuD90	130	0.288	0.200	0.257	0.321	0.357	0.300	0.200	0.297	0.275
	134	0.712	0.800	0.743	0.679	0.643	0.700	0.800	0.703	0.725
GmuD107	177	0.212	0.100	0.143	0.036	0.214	0.100	0.200	0.111	0.144
	181	0.000	0.100	0.029	0.052	0.000	0.033	0.000	0.034	0.030
	185	0.091	0.000	0.057	0.031	0.048	0.000	0.100	0.045	0.047
	189	0.030	0.000	0.014	0.010	0.000	0.000	0.050	0.014	0.015
	193	0.106	0.000	0.271	0.232	0.167	0.233	0.100	0.197	0.158
	198	0.152	0.050	0.086	0.119	0.071	0.100	0.200	0.113	0.111
	202	0.106	0.000	0.029	0.072	0.095	0.100	0.100	0.072	0.072
	205	0.000	0.000	0.000	0.015	0.024	0.000	0.000	0.009	0.006
	210	0.015	0.200	0.086	0.139	0.024	0.133	0.050	0.100	0.092
	214	0.197	0.300	0.129	0.216	0.238	0.300	0.150	0.208	0.219
	218	0.091	0.250	0.157	0.077	0.119	0.000	0.050	0.097	0.106
GmuD121	155	0.212	0.250	0.229	0.372	0.452	0.467	0.350	0.331	0.333
	159	0.000	0.000	0.014	0.029	0.048	0.000	0.050	0.021	0.020
	163	0.106	0.250	0.243	0.041	0.000	0.033	0.100	0.093	0.110
	167	0.197	0.050	0.029	0.087	0.214	0.067	0.100	0.105	0.106
	168	0.197	0.200	0.200	0.174	0.024	0.033	0.100	0.155	0.133
	171	0.091	0.000	0.000	0.000	0.024	0.033	0.050	0.021	0.028
	172	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000	0.050	0.007	0.011
	175	0.061	0.150	0.186	0.099	0.071	0.133	0.100	0.110	0.114
	179	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.067	0.050	0.010	0.020
	183	0.076	0.050	0.043	0.122	0.119	0.133	0.050	0.095	0.085
	188	0.061	0.050	0.029	0.076	0.024	0.033	0.000	0.052	0.039

ANNEXE E
STRUCTURE results for complete dataset

Figure E.1. Mean $\text{LnP}(K)$ of the complete dataset after Bayesian clustering analysis in STRUCTURE



ANNEXE F

DAPC sample location assignment, location of origin and percentage of correct assignment for sampling location with at least 10 individuals

Table F.1. Sample location assignment vs location of origin for the six sampling locations with a minimum of ten individuals

Origin	Assigned						SL 17	Total
	SL 1	SL 2	SL 3	SL 4	SL 5	SL 6		
SL 1	24	0	4	4	1	0	0	33
SL 2	0	1	9	0	0	0	0	10
SL 3	4	1	17	12	1	0	0	35
SL 4	6	0	8	83	3	0	0	100
SL 5	0	0	0	13	8	0	0	21
SL 6	0	0	1	13	1	0	0	15
SL 7	1	0	0	4	4	1	0	10
Total	36	2	35	123	18	0	0	24

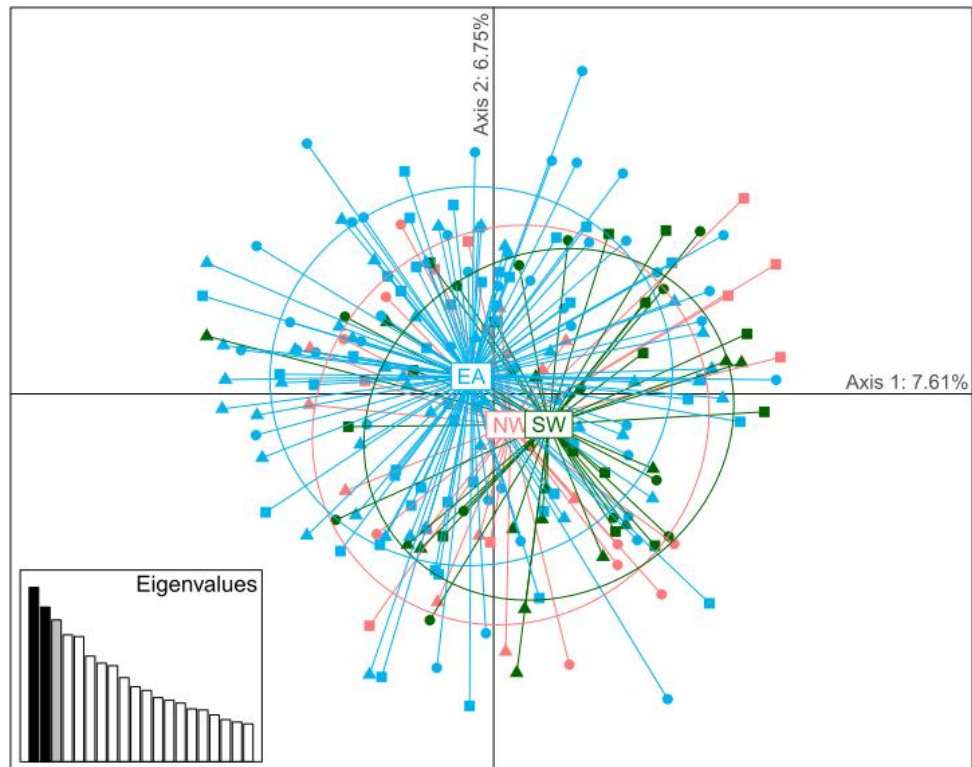
Table F.2 Percentage of correct assignment for the six sample locations with a minimum of ten individuals

	Origin						SL 17	Total
	SL 1	SL 2	SL 3	SL 4	SL 5	SL 6		
Correctly assigned	72.7%	10.0%	48.6%	83.0%	38.1%	0.0%	0.0%	59.4%
Wrongly assigned	27.3%	90.0%	51.4%	17.0%	61.9%	100.0%	100.0%	40.6%

ANNEXE G

PCA Plot of the three demes

Figure G.1. PCA plot of the three demes



ANNEXE H

DAPC sample location assignation, location of origin and percentage of correct assignation for the three demes

Table H.1. Sample location assignation vs location of origin for the three demes

Origin	Assigned			Total
	NW	SW	EA	
NW	24	4	5	33
SW	4	26	15	45
EA	6	10	120	136
Total	34	40	140	214

Table H.2 Percentage of correct assignation for the three demes

	Origin			Total
	NW	SW	EA	
Correctly assigned	73%	58%	88%	79.4%
Wrongly assigned	27%	42%	12%	20.6%

ANNEXE I

Values of N_e according to age of first reproduction

Table I: Values of N_e according to the age of first reproduction

	Mean N_e [95 % Conf. Int]		
	17.5 years old	20 years old	25 years old
NW	22.3 [16.2 – 31.9]	21.9 [16.0 – 31.4]	21.4 [15.6 – 30.6]
SW	91.9 [57.5– 192.8]	90.5 [56.6 – 189.9]	88.3 [55.3 – 185.4]
EA	159.4 [116.6 – 236.0]	157.0 [114.9 – 232.6]	153.2 [112.2 – 227.0]
Outaouais	156.4 [128.6 – 194.2]	154.1 [126.7 – 191.3]	150.4 [123.6 – 186.7]

RÉFÉRENCES

- Alacs, E. A., Janzen, F. J., & Scribner, K. T. (2007). Genetics Issues Genetic Issues in Freshwater Turtle and Tortoise Conservation. *Chelonian Research Monographs*, 4, 107–123.
- Allendorf, F. W. (1983). Isolation, Gene Flow, and Genetic Differentiation Among Population. *Great Lakes Fishery Commission*. Department of Zoology, University of Montana, Missoula, MT. 26 p.
- Anthonyamy, W. J. B., Dreslik, M. J., Douglas, M. R., Thompson, D., Klut, G. M., Kuhns, A. R., Mauger, D., Kirk, D., Glowacki, G. A., Douglas, M. E., & Phillips, C. A. (2018). Population genetic evaluations within a co-distributed taxonomic group: a multi-species approach to conservation planning. *Animal Conservation*, 21(2), 137–147. <https://doi.org/10.1111/acv.12365>
- Auge, A. C., Blouin-Demers, G., Hasler, C. T., & Murray, D. L. (2024). Demographic evidence that development is not compatible with sustainability in semi-urban freshwater turtles. *Animal Conservation*, 27(2), 253–266. <https://doi.org/10.1111/acv.12903>
- Baguette, M. (2004). The classical metapopulation theory and the real, natural world: a critical appraisal. *Basic and Applied Ecology*, 5(3), 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2004.03.001>
- Balkenhol, N., Cushman, S., Storfer, A., & Waits, L. P. (2016). Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex. 287 p.
- Bassett, B. (2024). Comparison of the Conservation Genetics of Blanding's Turtles (*Emydoidea blandingii*) in the Eastern Great Lakes & Northeast Regions. Department of Biological Sciences at Purdue Fort Wayne, Fort Wayne, Indiana. 100 p.
- Beaudry, F., DeMaynadier, P. G., & Hunter, M. L. (2009). Seasonally Dynamic Habitat Use by Spotted (Clemmys guttata) and Blanding's Turtles (Emydoidea blandingii) in Maine. *Journal of Herpetology*, 43(4), 636–645. <https://doi.org/10.1670/08-127.1>
- Bonebrake, T. C., Christensen, J., Boggs, C. L., & Ehrlich, P. R. (2010). Population decline assessment, historical baselines, and conservation. In *Conservation Letters* (Vol. 3, Issue 6, pp. 371–378). <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00139.x>
- Bouzat, J. L., Cheng, H. H., Lewin, H. A., Westemeier, R. L., Brawn, J. D., & Paige, K. N. (1998). Genetic Evaluation of a Demographic Bottleneck in the Greater Prairie Chicken. *Conservation Biology*, 12(4), 836–843. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1998.97164.x>
- Brassel, K. E., & Reif, D. (1979). A Procedure to Generate Thiessen Polygons. *Geographical Analysis*, 11(3), 289–303. <https://doi.org/10.1111/j.1538-4632.1979.tb00695.x>
- Browne, C. L., & Hecnar, S. J. (2007). Species loss and shifting population structure of freshwater turtles despite habitat protection. *Biological Conservation*, 138(3–4), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.008>
- Congdon, J. D., Dunham, A. E., Van, R. C., & Sels, L. (1993). Delayed sexual maturity and demographics of Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*): implications for conservation and

management of long-lived organisms. *Biological Conservation*, 70(4), 826–833.
[https://doi.org/10.1016/0006-3207\(94\)90202-X](https://doi.org/10.1016/0006-3207(94)90202-X)

Congdon, J. D., Kinney, O. M., & Nagle, R. D. (2011). Spatial ecology and core-area protection of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*). *Canadian Journal of Zoology*, 89(11), 1098–1106.
<https://doi.org/10.1139/z11-091>

Congdon, J. D., & Loben Sels, R. C. van. (1991). Growth and body size in Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*): relationships to reproduction. *Canadian Journal of Zoology*, 69(1), 239–245.
<https://doi.org/10.1139/z91-036>

Congdon, J. D., & Van Loben Sels, R. C. (1993). Relationships of reproductive traits and body size with attainment of sexual maturity and age in Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*). *Journal of Evolutionary Biology*, 6(4), 547–557. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1993.6040547.x>

Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics*, 144(4), 2001–2014.
<https://doi.org/10.1093/genetics/144.4.2001>

COSEPAC. (2016). Évaluation et Rapport de situation du COSEPAC sur la Tortue mouchetée (*Emydoidea blandingii*) - Population de la Nouvelle-Écosse et population des Grands-Lacs et du Saint-Laurent au Canada. *Comité sur la situation des espèces en péril au Canada*. Ottawa. xxi + 124 p.
(<http://www.registrelep-sararegistry.gc.ca/default.asp?lang=Fr&n=24F7211B-1>)

COSEWIC. (2016). COSEWIC Assessment and Status Report on the Blanding's Turtle (*Emydoidea blandingii*) - Nova Scotia population and Great Lakes/St. Lawrence population in Canada. *Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada*. Ottawa. xix + 110 p.
www.sararegistry.gc.ca/status/status_e.cfm

COSEWIC. (2023, November). COSEWIC definitions and abbreviations.
<https://cosewic.ca/index.php/en/about-us/definitions-abbreviations.html>

Crow, J. F. (2010). Wright and Fisher on Inbreeding and Random Drift. *Genetics*, 184(3), 609–611.
<https://doi.org/10.1534/genetics.109.110023>

Davy, C. M., Bernardo, P. H., & Murphy, R. W. (2014). A Bayesian approach to conservation genetics of Blanding's turtle (*Emys blandingii*) in Ontario, Canada. *Conservation Genetics*, 15(2), 319–330.
<https://doi.org/10.1007/s10592-013-0540-5>

Davy, C. M., & Murphy, R. W. (2014). Conservation genetics of the endangered spotted turtle (*Clemmys guttata*) illustrate the risks of “bottleneck tests.” In *Canadian Journal of Zoology* (Vol. 92, Issue 2, pp. 149–162). <https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0188>

De Meeûs, T. (2018). Revisiting FIS, FST, Wahlund Effects, and Null Alleles. *Journal of Heredity*, 109(4), 446–456. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx106>

Désilets, L. (2024). Conservation de la tortue mouchetée (*Emydoidea blandingii*): Évaluation de l'état des populations en Outaouais. Université du Québec en Outaouais. 84 p.

- Díez-del-Molino, D., Sánchez-Barreiro, F., Barnes, I., Gilbert, M. T. P., & Dalén, L. (2018). Quantifying Temporal Genomic Erosion in Endangered Species. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(3), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.12.002>
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14, 209–214. <https://www.molecularfisherieslaboratory.com.au/neestimator-software/>
- Ducks Unlimited Canada. (2010). Southern Ontario Wetland Conversion Analysis - Final Report. 51 p.
- Dutton, P. H., Bowen, B. W., Owens, D. W., Barragan, A., & Davis, S. K. (1999). Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Zoology*, 248(3), 397–409. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1999.tb01038.x>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- ECCC. (2018). Programme de rétablissement de la tortue mouchetée (*Emydoidea Blandingii*), population des Grands Lacs et du Saint-Laurent, au Canada. *Série de Programmes de rétablissement de la Loi sur les espèces en péril*. Environnement et Changement climatique Canada. Ottawa. viii + 64 p. (<http://registrelep-sararegistry.gc.ca/default.asp?lang=Fr&n=6B319869-1>)
- Edge, C. B., Steinberg, B. D., Brooks, R. J., & Litzgus, J. D. (2010). Habitat selection by Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*) in a relatively pristine landscape. *Ecoscience*, 17(1), 90–99. <https://doi.org/10.2980/17-1-3317>
- Ehrlich, P. R., & Pringle, R. M. (2008). Where does biodiversity go from here? A grim business-as-usual forecast and a hopeful portfolio of partial solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(supplement_1), 11579–11586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801911105>
- Ernst, C. H., & Lovich, J. E. (2009). Turtles of the United States and Canada (Second Edition). The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 840 p. (https://books.google.ca/books?id=nNOQghYEXZMC&printsec=frontcover&hl=fr&source=gbs_atb&pli=1#v=onepage&q&f=false)
- ÉRTQ. (2020). Plan de rétablissement de la tortue mouchetée (*Emydoidea blandingii*) au Québec - 2020-2030. Produit pour le ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Direction générale de la gestion de la faune et des habitats. *Équipe de rétablissement des tortues du Québec*. 52 p. (https://mffp.gouv.qc.ca/documents/faune/especes/plan_retablissement_tortue-mouchetee_2020-)
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>

Fahrig, L. (2003). Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 487–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419>

Fardila, D., Kelly, L. T., Moore, J. L., & McCarthy, M. A. (2017). A systematic review reveals changes in where and how we have studied habitat loss and fragmentation over 20 years. *Biological Conservation*, 212, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.04.031>

Frankham, R. (1995a). Conservation Genetics. *Annual Review of Genetics*, 29(1), 305–327. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001513>

Frankham, R. (1995b). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research*, 66(2), 95–107. <https://doi.org/10.1017/S0016672300034455>

Frankham, R., Ballou, J. D., Eldridge, M. D. B., Lacy, R. C., Ralls, K., Dudash, M. R., & Fenster, C. B. (2011). Predicting the Probability of Outbreeding Depression. *Conservation Biology*, 25(3), 465–475. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01662.x>

Fraser, D. J., & Bernatchez, L. (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10(12), 2741–2752. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.t01-1-01411.x>

Fyson, V. K., & Blouin-Demers, G. (2021). Effects of landscape composition on wetland occupancy by Blanding's Turtles (*Emydoidea blandingii*) as determined by environmental DNA and visual surveys. *Canadian Journal of Zoology*, 99(8), 672–680. <https://doi.org/10.1139/cjz-2021-0004>

Gallego-García, N., Forero - Medina, G., Vargas - Ramírez, M., Caballero, S., & Shaffer, H. B. (2019). Landscape genomic signatures indicate reduced gene flow and forest - associated adaptive divergence in an endangered neotropical turtle. *Molecular Ecology*, 28(11), 2757–2771. <https://doi.org/10.1111/mec.15112>

Glowacki, G., & Kuhns, A. R. (2010). Recovery of the Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*) at Spring Bluff Nature Preserve, Lake County Forest Preserve - Final report. 41 p. <https://dnr.illinois.gov/content/dam/soi/en/web/dnr/conservation/iwap/documents/swgreports/t-39-d-1-final-recovery-of-the-blandings-turtle.pdf>

González-Porter, G. P., Maldonado, J. E., Flores-Villela, O., Vogt, R. C., Janke, A., Fleischer, R. C., & Hailer, F. (2013). Cryptic Population Structuring and the Role of the Isthmus of Tehuantepec as a Gene Flow Barrier in the Critically Endangered Central American River Turtle. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071668>

Goudet, J. (2005). HIERFSTAT , a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 184–186. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8278>

Grossen, C., Guillaume, F., Keller, L. F., & Croll, D. (2020). Purging of highly deleterious mutations through severe bottlenecks in Alpine ibex. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14803-1>

Guinto, D., Cross, M., Lipps, G., Lee, Y., Kingsbury, B., Earl, D., Dempsey, C., Hinson, J., & Jordan, M. (2023). Conservation Genetic Analysis of Blanding's Turtles across Ohio, Indiana, and Michigan. *Diversity*, 15(5), 668. <https://doi.org/10.3390/d15050668>

Hardy, G. H. (1908). Mendelian Proportions in a Mixed Population. *Science*, 28(706), 49–50. <https://doi.org/10.1126/science.28.706.49>

Hedrick, P. W. (2005). A Standardized Genetic Differentiation Measure. *Evolution*, 59(8), 1633–1638. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01814.x>

Hey, J., & Machado, C. A. (2003). The study of structured populations — new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics*, 4(7), 535–543. <https://doi.org/10.1038/nrg1112>

Hill, W. G. (1981). Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research*, 38(3), 209–216. <https://doi.org/10.1017/S0016672300020553>

Hohenlohe, P. A., Funk, W. C., & Rajora, O. P. (2021). Population genomics for wildlife conservation and management. *Molecular Ecology*, 30(1), 62–82. <https://doi.org/10.1111/mec.15720>

Holbrook, J. E. (1838). North American Herpetology; Or, a Description of the Reptiles inhabiting the United States (1st ed., Vol. 3). J. Dobson. Philadelphia. 199 p.

Holland Stephens, S. (2003). Genetic Analysis of the Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*) with Estimates of Effective Population Size. Texas A&M University. 100 p.

Jackson, N. D., & Fahrig, L. (2016). Habitat amount, not habitat configuration, best predicts population genetic structure in fragmented landscapes. *Landscape Ecology*, 31(5), 951–968. <https://doi.org/10.1007/s10980-015-0313-2>

Jombart, T. (2008). adegenet : a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>

Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>

Jordan, M. A., Reid, B. N., Guinto, D. J., Anthonyamy, W. J. B., Davy, C. M., Rhymer, J., Marchand, M., Cross, M., Lipps, G., Lee, Y. M., Kingsbury, B., Willey, L., Jones, M., Mays, J., Johnson, G., & Erb, L. (2024). Patterns of Contemporary Genetic Variation and Effective Population Size in Blanding's Turtle Populations. *Northeastern Naturalist*, 31(sp12), 12. <https://doi.org/10.1656/045.031.s1230>

Jost, L. (2008). GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17(18), 4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>

Joyal, L. A., McCollough, M., & Hunter, M. L. (2001). Landscape Ecology Approaches to Wetland Species Conservation: a Case Study of Two Turtle Species in Southern Maine. *Conservation Biology*, 15(6), 1755–1762. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.98574.x>

Keller, L., & Waller, D. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(5), 230–241. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02489-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02489-8)

King. (2023). PVA-based assessment of resiliency, redundancy, and representation in an imperiled freshwater turtle. *Global Ecology and Conservation*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02419>

King, T. L., & Julian, S. E. (2004). Conservation of microsatellite DNA flanking sequence across 13 Emydid genera assayed with novel bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*) loci. *Conservation Genetics*, 5(5), 719–725. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-1854-0>

Kronenberger, J. A., Funk, W. C., Smith, J. W., Fitzpatrick, S. W., Angeloni, L. M., Broder, E. D., & Ruell, E. W. (2017). Testing the demographic effects of divergent immigrants on small populations of Trinidadian guppies. *Animal Conservation*, 20(1), 3–11. <https://doi.org/10.1111/acv.12286>

Kuo, C.-H., & Janzen, F. J. (2004). Genetic Effects of a Persistent Bottleneck on a Natural Population of Ornate Box Turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics*, 5, 425–437. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000041020.54140.45>

Lande, R. (1998). Anthropogenic, Ecological and Genetic Factors in Extinction and Conservation. *Population Ecology*, 40(3), 259–269.

Laroche, D. and Plourde, M. (2017). Eau – Dans le sillage du temps. *Éditions de l'Homme*, Pointes-à-Callière, cité d'archéologie et d'histoire de Montréal. Montréal (Canada). 215p.

Lefebvre, J., Avery, T. S., & Herman, T. B. (2011). Size Dimorphism and Growth Rates in Distinct Populations of Blanding's Turtles (*Emydoidea blandingii*) in Nova Scotia in Relation to Environment. *Herpetological Conservation and Biology*, 6(3), 465–472.

Lesturgie, P., Lainé, H., Asuwalski, A., Chifflet--Belle, P., Maisano Delser, P., Magalon, H., & Mona, S. (2022). Life history traits and biogeographic features shaped the complex evolutionary history of an iconic apex predator (*Galeocerdo cuvier*). *BMC Ecology and Evolution*, 22(147), 1-23.

Libants, S., Kamarainen, A. M., Scribner, K. T., & Congdon, J. D. (2004). Isolation and cross-species amplification of seven microsatellite loci from *Emydoidea blandingii*. *Molecular Ecology Notes*, 4(2), 300–302. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00650.x>

Lino, A., Fonseca, C., Rojas, D., Fischer, E., & Ramos Pereira, M. J. (2019). A meta-analysis of the effects of habitat loss and fragmentation on genetic diversity in mammals. *Mammalian Biology*, 94, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.09.006>

- Lynch, M., Conery, J., & Burger, R. (1995). Mutation Accumulation and the Extinction of Small Populations. *The American Naturalist*, 146(4), 489–518.
- Manel, S., & Holderegger, R. (2013). Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(10), 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.012>
- Mantel, N. (1967). The Detection of Disease Clustering and Generalized Regression Approach. *Cancer Research*, 27, 209–220. http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/27/2_Part_1/209/2382183/cr0272p10209.pdf
- Marchand, M. N., & Litvaitis, J. A. (2004). Effects of habitat features and landscape composition on the population structure of a common aquatic turtle in a legion undergoing rapid development. *Conservation Biology*, 18(3), 758–767. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2004.00019.x>
- Marsack, K., & Swanson, B. J. (2009). A Genetic Analysis of the Impact of Generation Time and Road-Based Habitat Fragmentation on Eastern Box Turtles (*Terrapene c. carolina*). *Copeia*, 2009(4), 647–652. <https://doi.org/10.1643/CE-08-233>
- McCluskey, E. M., Mockford, S. W., Sands, K., Herman, T. B., Johnson, G., & Gonser, R. A. (2016). Population Genetic Structure of Blanding’s Turtles (*Emydoidea blandingii*) in New York. *Journal of Herpetology*, 50(1), 70–76. <https://doi.org/10.1670/14-027>
- McCoy, E. D., & Mushinsky, H. R. (1999). Habitat fragmentation and the abundances of vertebrates in the Florida scrub. *Ecology*, 80(8), 2526–2538. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[2526:HFATAO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[2526:HFATAO]2.0.CO;2)
- McGuire, J. M., Scribner, K. T., & Congdon, J. D. (2013). Spatial aspects of movements, mating patterns, and nest distributions influence gene flow among population subunits of Blanding’s turtles (*Emydoidea blandingii*). *Conservation Genetics*, 14(5), 1029–1042. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0493-8>
- McNeil, J. M. (2002). Distribution, movements, morphology and reproduction in a population of Blanding’s turtle (*Emydoidea blandingii*) in an unprotected landscape in southwestern Nova Scotia [M. Sc. Thesis]. Acadia University, Wolfville, Nova Scotia, Canada.
- McRae, B. H., & Beier, P. (2007). Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19885–19890. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706568104>
- Miermans, P. G. (2020). GENODIVE version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources*, 20, 1126–1131. <http://www.patrickmeirmans.com/software/>
- Mockford, S. W., Herman, T. B., Snyder, M., & Wright, J. M. (2007). Conservation genetics of Blanding’s turtle and its application in the identification of evolutionarily significant units. *Conservation Genetics*, 8(1), 209–219. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9163-4>

- Mockford, S. W., McEachern, L., Herman, T. B., Snyder, M., & Wright, J. M. (2005). Population genetic structure of a disjunct population of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*) in Nova Scotia, Canada. *Biological Conservation*, 123(3), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.11.021>
- Moritz, C. (1994). Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(10), 373–375. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90057-4)
- Nadachowska - Brzyska, K., Konczal, M., & Babik, W. (2022). Navigating the temporal continuum of effective population size. *Methods in Ecology and Evolution*, 13(1), 22 – 41. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13740>
- Nei, M., Maruyama, T., & Chakraborty, R. (1975). The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. *Evolution*, 29(1), 1. <https://doi.org/10.2307/2407137>
- Nielsen, E. S., Beger, M., Henriques, R., & von der Heyden, S. (2020). A comparison of genetic and genomic approaches to represent evolutionary potential in conservation planning. *Biological Conservation*, 251, 108770. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108770>
- Nunney, L. (1993). The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution*, 47(5), 1329–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb02158.x>
- O'Brien, S. J., & Evermann, J. F. (1988). Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 3(10), 254–259. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(88\)90058-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(88)90058-4)
- Osentoski, M. F., Mockford, S., Wright, J. M., Snyder, M., Herman, T. B., & Hughes, C. R. (2002). Isolation and characterization of microsatellite loci from the Blanding's turtle, *Emydoidea blandingii*. *Molecular Ecology Notes*, 2(2), 147–149. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00176.x>
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419–420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>
- Peery, M. Z., Kirby, R., Reid, B. N., Stoelting, R., Doucet - Bëer, E., Robinson, S., Vásquez - Carrillo, C., Pauli, J. N., & Palsbøll, P. J. (2012). Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology*, 21(14), 3403–3418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05635.x>
- Pflüger, F. J., Signer, J., & Balkenhol, N. (2019). Habitat loss causes non-linear genetic erosion in specialist species. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00507. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2018.e00507>
- Phalan, B., Hayes, G., Brooks, S., Marsh, D., Howard, P., Costelloe, B., Vira, B., Kowalska, A., & Whitaker, S. (2018). Avoiding impacts on biodiversity through strengthening the first stage of the mitigation hierarchy. *ORYX*, 52(2), 316–324. <https://doi.org/10.1017/S0030605316001034>
- Piepgas, S. A., & Lang, J. W. (2000). Spatial Ecology of Blanding's Turtle in Central Minnesota. *Chelonian Conservation and Biology*, 3(4), 589–601. https://www.researchgate.net/publication/255965409_Spatial_Ecology_of_Blanding's_Turtle_in_Central_Minnesota

Postaire, B. D., Devloo - Delva, F., Brunnschweiler, J. M., Charvet, P., Chen, X., Cliff, G., Daly, R., Drymon, J. M., Espinoza, M., Fernando, D., Glaus, K., Grant, M. I., Hernandez, S., Hyodo, S., Jabado, R. W., Jaquemet, S., Johnson, G., Naylor, G. J. P., Nevill, J. E. G., ... Mona, S. (2024). Global genetic diversity and historical demography of the Bull Shark. *Journal of Biogeography*, 51(4), 632–648. <https://doi.org/10.1111/jbi.14774>

Primack, R. B. (1993). Essentials of conservation biology. *Sinauer Associates*. Sunderland. 564 p. <https://archive.org/details/essentialsofcons0000prim/page/n7/mode/2up>

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/155.2.945>

R Core team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>

Read, K. D., & Thompson, B. (2021). Retrofit ecopassages effectively reduce freshwater turtle road mortality in the Lake Simcoe Watershed. *Conservation Science and Practice*, 3(9). <https://doi.org/10.1111/csp2.491>

Reid, B. N., Mladenoff, D. J., & Peery, M. Z. (2017). Genetic effects of landscape, habitat preference and demography on three co - occurring turtle species. *Molecular Ecology*, 26(3), 781 – 798. <https://doi.org/10.1111/mec.13962>

Rice, W. R. (1989). Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, 43(1), 223. <https://doi.org/10.2307/2409177>

Rousset, F. (1997). Genetic Differentiation and Estimation of Gene Flow from F-Statistics Under Isolation by Distance. *Genetics*, 145(4), 1219–1228. <https://doi.org/10.1093/genetics/145.4.1219>

Rowe, J. W. (1987). Seasonal And Daily Activity In A Population Of Blanding’S Turtle (*Emydoidea blandingi*) In Northern Illinois [Master of Science, Eastern Illinois University]. <http://thekeep.eiu.edu/theses/716>

Rowe, J. W., & Moll, E. O. (1991). A Radiotelemetric Study of Activity and Movements of the Blanding’s Turtle (*Emydoidea blandingi*) in Northeastern Illinois. *Journal of Herpetology*, 25(2), 178. <https://doi.org/10.2307/1564646>

Santiago, E., Novo, I., Pardiñas, A. F., Saura, M., Wang, J., & Caballero, A. (2020). Recent demographic history inferred by high-resolution analysis of linkage disequilibrium. *Molecular Biology and Evolution*, 37(12), 3642–3653. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa169>

Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233–234. <https://doi.org/10.1038/72708>

Schwartz, M. K., Luikart, G., & Waples, R. S. (2007). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 22, Issue 1, pp. 25–33). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.08.009>

Sethuraman, A., McGaugh, S. E., Becker, M. L., Chandler, C. H., Christiansen, J. L., Hayden, S., LeClere, A., Monson-Miller, J., Myers, E. M., Paitz, R. T., Refsnider, J. M., VanDeWalle, T. J., & Janzen, F. J. (2014). Population genetics of Blanding's turtle (*Emys blandingii*) in the midwestern United States. *Conservation Genetics*, 15, 61–73. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0521-8>

Shaffer, M. (1987). Minimum viable populations: coping with uncertainty. In M. Shaffer (Ed.), *Viable Populations for Conservation* (pp. 69–86). *Cambridge University Press*.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511623400.006>

SignaGen. (2016). Universal Primer List. <https://signagen.com/blog/2015/11/06/universal-primer-list/>

Slatkin, M. (1993). Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations. *Evolution*, 47(1), 264–279. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb01215.x>

SoftGenetics. (2014). GeneMarker (v3.0.1).

Spradling, T. A., Tamplin, J. W., Dow, S. S., & Meyer, K. J. (2010). Conservation genetics of a peripherally isolated population of the wood turtle (*Glyptemys insculpta*) in Iowa. *Conservation Genetics*, 11(5), 1667–1677. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0059-y>

St-Hilaire, D. (2003). Rapport sur la situation de la tortue mouchetée (*Emydoidea blandingii*) au Québec. *Société de la faune et des parcs du Québec, Direction de l'aménagement de la faune de l'Outaouais*. Hull. 27 p.

Storfer, A., Murphy, M. A., Spear, S. F., Holderegger, R., & Waits, L. P. (2010). Landscape genetics: where are we now? *Molecular Ecology*, 19(17), 3496–3514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04691.x>

Summerhayes, C. and Charman, D. (2015). Introduction to Holocene Climate Change: new perspectives. *Journal of the Geological Society*, 172(2), 251–253. <https://doi.org/10.1144/jgs2014-113>

Tajima, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 597–601. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.597>

Taylor, B. L., & Dizon, A. E. (1999). First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology*, 8(s1), S11–S16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00797.x>

Taylor, P. D., Fahrig, L., & With, K. A. (2006). Landscape connectivity: a return to the basics. In *Connectivity Conservation* (pp. 29–43). *Cambridge University Press*.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511754821.003>

Taylor, P., Fahrig, L., Henein, K., & Merriam, G. (1993). Connectivity Is a Vital Element of Landscape Structure. *Oikos*, 68(3), 571. <https://doi.org/10.2307/3544927>

Tessier, N., Paquette, S. R., & Lapointe, F.-J. (2005). Conservation genetics of the wood turtle (*Glyptemys insculpta*) in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 83(6), 765–772.
<https://doi.org/10.1139/z05-065>

van Dijk, P. P., & Rhodin, A. G. J. (2010). *Emydoidea blandingii*: (errata version published in 2019). In *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T7709A155088836.en>

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). <scp>micro</scp> - <scp>checker</scp> : software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>

Varvio, S.-L., Chakraborty, R., & Nei, M. (1986). Genetic variation in subdivided populations and conservation genetics. *Heredity*, 57(2), 189–198. <https://doi.org/10.1038/hdy.1986.109>

Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(supplement_1), 11466–11473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>

Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10(4), 506–513. <https://doi.org/10.2144/000114018>

Wang, J., Santiago, E., & Caballero, A. (2016). Prediction and estimation of effective population size. *Heredity*, 117(4), 193–206. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.43>

Waples, R. S., Antao, T., & Luikart, G. (2014). Effects of Overlapping Generations on Linkage Disequilibrium Estimates of Effective Population Size. *Genetics*, 197(2), 769–780. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.164822>

Weinberg, W. (1908). Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. Jahreshauptversammlung Des Vereins Für Vaterländische Naturkunde in Württemberg, 64, 369–382. <https://wellcomecollection.org/works/ek48psze/items>

Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>

Whelan, R. J., Brown, C. L., & Farrier, D. (2004). The precautionary principle: what is it and how might it be applied in threatened species conservation? *Threatened Species Legislation: Is It Just an Act?*, 49–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.7882/0958608598>

With, K. A. (2019). Essentials of Landscape Ecology. In O. U. Press (Ed.), Essentials of Landscape Ecology. Oxford University Press. Oxford. 641 p. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198838388.001.0001>

Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian Populations. *Genetics*, 16, 97–159.