

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC EN OUTAOUAIS

ÉCHOS DES APPALACHES : STRUCTURE GÉNÉTIQUE D'UNE ESPÈCE D'ARBRE MENACÉE À TRAVERS L'EST
DE L'AMÉRIQUE DU NORD

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

PIER-ALEXANDRE GRENIER

SEPTEMBRE 2025

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à ma direction de recherche, Yann Surget-Groba et Nathalie Isabel, sans qui ce projet n'aurait pas été possible. Leur soutien et leurs conseils éclairés m'ont permis de me former comme scientifique et, plus spécifiquement en génomique, un domaine que je ne connaissais que superficiellement il y a peu de temps. Leur expertise et leur accompagnement m'ont permis d'atteindre mon objectif : réaliser une contribution significative pour la conservation de la biodiversité.

Je souhaite également remercier chaleureusement mes collaboratrices aux États-Unis, Kyra LoPiccolo et Jill Hamilton, qui ont rendu possible l'étude de toute l'aire de distribution du frêne noir. Leur apport pour compléter l'échantillonnage de l'autre côté de la frontière, pour l'extraction de l'ADN et pour la bioinformatique a été essentiel au projet.

Un grand merci à Lyne Touchette qui a été mon bras droit tout au long du projet. Sa grande implication et sa proactivité, notamment dans la gestion des échantillons et au laboratoire, ont permis de surmonter de nombreuses difficultés et imprévus. Un grand merci aussi à Manuel Lamothe qui m'a accompagné durant mes analyses et dont les conseils ont été d'une grande aide.

Merci à mes collègues Baptiste Postaire, Alix Pugeaut, Zoé Ribeyre et Lisa Tischenko pour tous leurs conseils et pour tous leurs encouragements. Merci aussi aux nombreuses autres personnes qui ont contribué de près ou de loin au projet. Ce mémoire est l'aboutissement d'un grand travail collaboratif.

Pour conclure, j'adresse un merci tout particulier à ma famille et à mes amis. Leur appui indéfectible au cours de ces deux années, ainsi que leurs encouragements constants, ont nourri mon énergie et soutenu mes efforts à chaque étape.

DÉDICACE

À tous ceux qui m'ont soutenu et permis d'aller au bout de ce grand projet.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
RÉSUMÉ	viii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 État des connaissances	4
1.2.1 Frênes.....	4
1.2.1.1 Phylogénie du genre <i>Fraxinus</i> et espèces au Canada	4
1.2.1.2 Statut de protection.....	4
1.2.2 Menaces.....	5
1.2.2.1 Agrile du frêne	5
1.2.2.2 Changements climatiques.....	6
1.2.2.3 Chalarose du frêne.....	7
1.2.3 Frêne noir.....	8
1.2.3.1 Importance.....	8
1.2.3.2 Description.....	9
1.2.4 Solutions	13
1.2.4.1 Conservation ex situ	13
1.2.4.2 Résistance naturelle de l'hôte	14
1.2.4.3 Génomique	16
1.2.4.3.1 Diversité génétique neutre.....	17
1.2.4.3.2 Diversité génétique adaptative	18
1.2.4.3.3 Diversité génétique du frêne noir.....	20
1.3 Hypothèse de travail	22
CHAPITRE 2 ECHOES OF THE APPALACHIANS: GENETIC STRUCTURE OF A THREATENED TREE SPECIES ACROSS EASTERN NORTH AMERICA	24
2.1 Abstract	24
2.2 Introduction	25
2.3 Materials and Methods.....	27
2.3.1 Sampling.....	27
2.3.2 DNA Processing.....	28
2.3.3 Bioinformatics.....	28
2.3.4 Data Analysis.....	29

2.4 Results	29
2.4.1 Sequencing results	29
2.4.2 Genetic Structure	30
2.4.3 Population Differentiation and Inbreeding Statistics	32
2.5 Discussion.....	33
2.6 Acknowledgements.....	36
2.7 Author Contributions	37
CHAPITRE 3 CONCLUSION GÉNÉRALE	38
ANNEXE A SUPPLEMENTARY FIGURES	40
ANNEXE B BLACK ASH LEAF COLLECTION PROTOCOL.....	46
ANNEXE C EXTRACTION PROTOCOL FOR BLACK ASH (<i>FRAXINUS NIGRA</i>) LEAF TISSUE	49
ANNEXE D METADATA FOR ALL SAMPLES INCLUDED IN THE STUDY, ORDERED FROM WEST TO EAST	54
BIBLIOGRAPHIE.....	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Agrile du frêne (a) et frênaie noire (b)	3
Figure 1.2 Feuilles du frêne noir, du frêne rouge et du frêne blanc	10
Figure 1.3 Cicatrices foliaires du frêne noir, du frêne rouge et du frêne blanc	11
Figure 1.4 Rameaux du frêne noir, du frêne rouge et du frêne blanc	11
Figure 1.5 Samares du frêne noir, du frêne rouge et du frêne blanc.....	12
Figure 1.6 a) Présence de deux groupes génétiques chez le frêne rouge avec une large zone d'introgession entre les deux, séparés par les Appalaches, suggérant la présence de deux refuges glaciaires distincts (d'après Huff <i>et al.</i> , 2022). b) Patrons convergeant de distribution génétique chez les arbres de l'Amérique du Nord qui coïncident avec des chaînes de montagnes telles les Appalaches ainsi que des refuges glaciaires potentiels (d'après Jaramillo-Correa <i>et al.</i> , 2009).....	22
Figure 1.7 Hypothèse : présence de deux groupes génétiques homogènes séparés par les Appalaches avec une zone d'introgession entre les deux	23
Figure 2.1 Distribution of black ash genetic clusters. Four clusters were identified: East, West, Wisconsin and Gaspereau (Nova Scotia). Each pie chart represents the average proportion of each genetic cluster within a population.....	31
Figure 2.2 Principal Components Analysis of black ash samples. Individuals cluster in four groups: East, West, Wisconsin and Gaspereau	32
Figure A.1 Detection of batch effect in genomic data: PCA reveals clustering by sequencing plate	41
Figure A.2 Batch effect correction: PCA after SNP filtering eliminates plate-associated clustering.....	41
Figure A.3 Cross-validation error rates for ADMIXTURE analysis (K = 1 to 10)	42
Figure A.4 ADMIXTURE bar plots for K = 1 to 10 showing ancestry proportions of black ash individuals ordered from west to east.....	43
Figure A.5 ADMIXTURE bar plots for K = 4 showing ancestry proportions of black ash individuals ordered from west to east.....	44
Figure A.6 Distribution of black ash genetic clusters (without overlapping population diagrams). Four clusters were identified: East, West, Wisconsin, and Gaspereau (Nova Scotia). Each pie chart represents the average proportion of each genetic cluster within a population	45

LISTE DES TABLEAUX

Table 2.1 Sequential filtering steps applied to GBS data showing sample and SNP retention at each bioinformatic stage.....	30
Table 2.2 Pairwise F_{ST} values showing genetic differentiation between black ash clusters	33
Table 2.3 Inbreeding coefficient (F_{IS}) for each black ash genetic clusters	33

RÉSUMÉ

La crise de la biodiversité affecte gravement les forêts, des écosystèmes clés où de nombreuses espèces sont en déclin. Par exemple, le frêne noir (*Fraxinus nigra*), une espèce d'arbre en danger critique d'extinction, subit un taux de mortalité dépassant 99 % à cause de l'agrile du frêne (*Agrilus planipennis*), l'insecte exotique le plus dommageable aux forêts nord-américaines. Espèce sacrée pour certaines Premières Nations, sa disparition entraînerait des changements majeurs dans les milieux humides et ripariens. Face à l'inéluctable progression de l'agrile du frêne, une récolte de graines ciblée est urgente pour préserver la diversité génétique nécessaire à son adaptation aux changements climatiques.

La connaissance de la structure génétique de l'espèce est importante pour mener à bien ces travaux, mais aucune étude n'a encore été publiée sur ce sujet. Dans mon projet de recherche, j'ai documenté la structure génétique du frêne noir à partir d'échantillons prélevés au Canada et aux États-Unis couvrant la majeure partie de l'aire de distribution. Ces échantillons ont par la suite été analysés par la méthode du génotypage par séquençage (GBS). Les résultats des analyses convergent et indiquent la présence de quatre groupes génétiques chez le frêne noir. Deux groupes principaux se situent à l'est et à l'ouest de l'aire de distribution, séparés par les Appalaches et présentant un gradient entre eux. Deux autres groupes génétiques, isolés, se trouvent respectivement au Wisconsin et à Gaspereau, en Nouvelle-Écosse.

Cette étude constitue une étape cruciale pour la préservation de la diversité génétique du frêne noir avant son extinction. Les efforts de récolte de graines doivent désormais cibler d'urgence ces quatre groupes afin de préserver la diversité génétique essentielle aux programmes de croisements pour la résistance et pour les futurs efforts de restauration, assurant ainsi la survie de l'espèce au-delà de la crise de l'agrile du frêne.

Mots clés : conservation et restauration d'espèces, génomique des populations, frêne noir

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Problématique

La biodiversité est la base sur laquelle repose la société humaine tant pour subvenir à ses besoins primaires que pour sa prospérité (McNeely *et al.*, 1990). L'être humain aurait transformé 45 % des écosystèmes terrestres depuis 1850 (Exposito-Alonso, 2023) et serait à l'origine de la sixième extinction de masse (Ceballos *et al.*, 2015). Alors que les extinctions de masses précédentes se déroulaient généralement sur une échelle de dizaines de milliers à quelques millions d'années, celle que l'on vit actuellement se déroulerait sur une période de seulement 200 ans. D'ici 2100, 50 % des espèces pourraient disparaître et la biosphère nécessiterait des millions d'années pour s'en remettre (Myers, 1993 ; Singh, 2002). Les principales causes de la perte de la biodiversité dans le monde en ordre décroissant sont la perte d'habitat, la surexploitation, les espèces invasives et les changements climatiques (Maxwell *et al.*, 2016).

Les arbres sont des espèces fondamentales dans les écosystèmes forestiers. Ils supportent un grand nombre d'espèces animales et végétales (Hämäläinen *et al.*, 2023). Cependant, pour plusieurs raisons incluant l'introduction d'agents pathogènes, le pourcentage d'espèces d'arbres menacées d'extinction est passé de 10 % en 1998 (Williams, 1998) à 38 % en 2024 (Union internationale pour la conservation de la nature, 2024). Désormais, au moins 142 espèces d'arbre sont éteintes en milieu naturel (Botanical Gardens Conservation International, 2021). Le nombre d'agents pathogènes qui envahit les forêts dans le monde est en croissance constante. La forte mortalité que certains causent chez leur hôte est expliquée par une absence de coévolution et donc de mécanisme de défense (Brockerhoff et Liebhold, 2017). La brûlure du châtaignier (*Cryphonectria parasitica*), la maladie hollandaise de l'orme (*Ophiostoma ulmi*) et la rouille vésiculeuse du pin blanc (*Cronartium ribicola*) sont trois exemples d'agents pathogènes qui ont déjà changé la composition forestière en Amérique du Nord (Pike *et al.*, 2021 ; Snieszko et Koch, 2017).

Plus récemment, l'agrile du frêne (*Agrilus planipennis*; Figure 1.1a) a envahi l'Amérique du Nord. Cet insecte originaire d'Asie de l'Est a fait son arrivée au Michigan aux débuts des années 1990 (Herms et McCullough, 2014). Ce coléoptère spécialiste des frênes a tué plus de 99 % des arbres du genre *Fraxinus* à l'épicentre de l'invasion (Klooster *et al.*, 2018). À ce jour, c'est l'insecte exotique introduit en Amérique du Nord le plus dommageable chez les arbres (Popkin, 2020). Son expansion se poursuit et devrait couvrir toute l'aire de distribution des frênes au Canada d'ici les 60 prochaines années (COSEPAC, 2019). L'agrile

du frêne et les changements climatiques sont deux menaces qui agissent en synergie pour mettre à mal la persistance des frênes (Iverson *et al.*, 2016). La première est en train de tuer des centaines de millions d'arbres tandis que la seconde favorise la survie hivernale du ravageur et dégrade la qualité de son habitat à long terme.

Le fort taux de mortalité des frênes entraîne une réduction de leur diversité génétique, qui constitue la clé de leur potentiel évolutif (Allendorf *et al.*, 2022). En Amérique du Nord, certains génotypes de frênes sont au cœur d'une plus grande résistance à l'agrile du frêne (Steiner *et al.*, 2019). Comme l'insecte est déjà bien établi sur le continent, l'éradication n'est plus une possibilité (Herms et McCullough, 2014). Il faut donc mettre en place un plan de lutte intégrée pour les préserver. Tout d'abord, en récoltant des graines des frênes sur l'ensemble de leur aire de répartition et en les conservant de manière ex situ, on s'assure de conserver la diversité génétique à long terme (Di Santo et Hamilton, 2021). Puis, l'injection d'un insecticide systémique dans quelques sites en bonne santé, mais à risque immédiat d'infestation dans chaque province/état permet de maintenir en vie des arbres qui pourraient servir de réservoir local de diversité génétique (LeMay, 2024 ; McCullough *et al.*, 2019). Cette méthode de contrôle chimique permet de gagner plusieurs années précieuses, le temps que la recherche scientifique progresse et que les parasitoïdes introduits pour contrôler les populations d'agrides du frêne s'établissent (Duan *et al.*, 2022, 2023 ; Morris *et al.*, 2023). Malgré la forte mortalité des frênes matures durant la première vague d'infestation de l'agrile du frêne, les semis en sous-étage représentent un espoir pour la persistance de ces espèces. Pour favoriser la régénération des frênes dans un peuplement où elle est bien établie, la technique sylvicole à employer est une éclaircie par le bas dans laquelle 50 % de la canopée est conservée. Alors que dans un peuplement où elle est peu établie, une éclaircie par le bas conservant 75 % de la canopée lors d'une bonne année semencière est à privilégier (Erdmann *et al.*, 1987). Ces opérations devraient être menées lorsque le sol est gelé pour éviter la compaction des sols et les dommages au site (Sims *et al.*, 1990). Finalement, une nouvelle approche centrée sur l'arbre visant à utiliser la diversité génétique présente au sein des espèces doit être employée pour augmenter leur résistance naturelle (Pike *et al.*, 2021). Un tel programme de croisements visant à amplifier la résistance naturelle à l'agrile du frêne est déjà en route pour le frêne rouge (*Fraxinus pennsylvanica*) et a démontré des résultats encourageants. Les descendants de parents résistants sont jusqu'à quatre fois plus résistants à l'agrile du frêne (Popkin, 2020).

Le frêne noir (*Fraxinus nigra*) est une espèce des milieux humides et ripariens du nord-est de l'Amérique du Nord (Figure 1.1b; Ehrenfeld, 2012 ; Sims *et al.*, 1990). Sa distribution est majoritairement canadienne (51 %; COSEPAC, 2019) et elle est l'espèce de frêne la plus répandue au Canada. Cependant, il est aussi l'espèce la plus vulnérable à l'agrile du frêne (Kelly *et al.*, 2020 ; Showalter *et al.*, 2020), une menace si grave qu'il est classé comme espèce en danger critique d'extinction par l'UICN depuis 2017 (Jerome *et al.*, 2017). Sa disparition entraînerait de grands changements dans les écosystèmes où il est présent (Wagner et Todd, 2015). Par ailleurs, le frêne noir revêt une valeur sacrée pour certains peuples des Premières Nations (Costanza *et al.*, 2017). Il est donc crucial d'agir immédiatement pour le sauvegarder afin qu'il puisse continuer de remplir son rôle écologique et spirituel.

Ma maîtrise s'inscrit dans le grand projet de sauvegarde du frêne noir mené en collaboration avec W8banaki, le Mohawk Council of Kahnawà:ke, et Ressources naturelles Canada. Mon rôle au sein de ce projet consiste à documenter la structure génétique de l'espèce. Cette information est importante pour mener à bien les travaux de conservation du frêne noir et sera utilisée dans les étapes subséquentes. Elle guidera notamment les programmes de récolte de semences pour la conservation ex situ de ses ressources génétiques sous forme de graines (Ressources naturelles Canada, 2025).

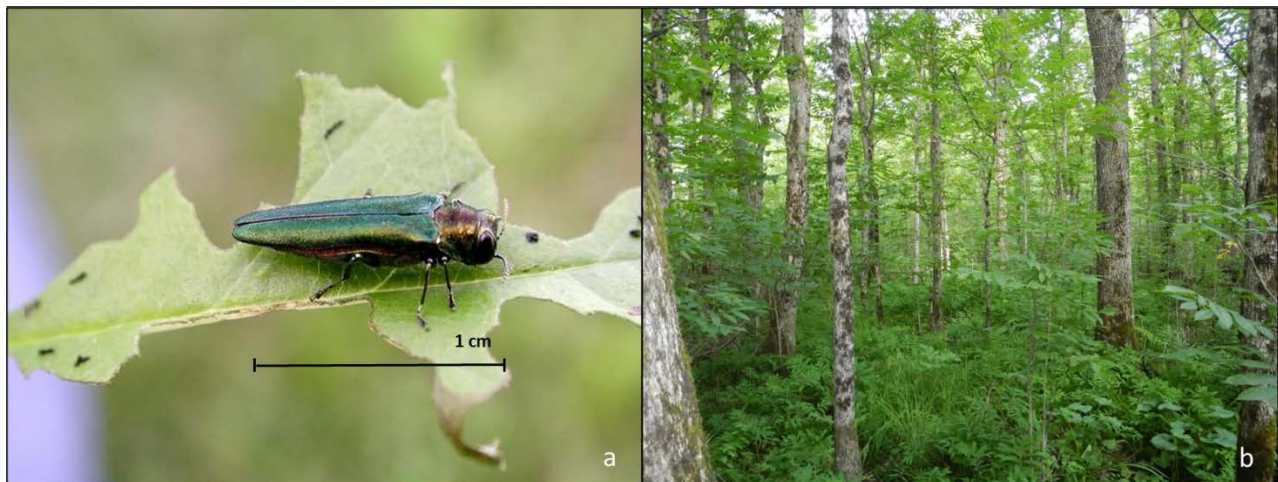


Figure 1.1 Agrile du frêne (a) et frênaie noire (b)

Adaptée de [Photographie de l'agrile du frêne], par D. Miller, 2024, Forestry Images.
(<https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5449380>). CC BY-NC 3.0

Tirée de [Photographie de frênaie noire], par A. F. Nolin, 2020, iNaturalist.
(<https://www.inaturalist.org/observations/41801901>). CC BY-NC 4.0

1.2 État des connaissances

1.2.1 Frênes

1.2.1.1 Phylogénie du genre *Fraxinus* et espèces au Canada

Hinsinger et coll. (2013) ont publié la phylogénie du genre *Fraxinus*. Dans cet article, ils mentionnent que ce genre serait apparu en Amérique du Nord il y a 45,4 millions d'années. Ensuite, il aurait migré par l'Asie jusqu'en Europe et en Afrique du Nord et il aurait migré une nouvelle fois d'Asie vers l'Amérique du Nord. Ces différents événements d'expansion territoriale auraient mené à la diversification du genre en six sections (*Dipetaleae*, *Melioides*, *Pauciflorae*, *Ornus*, *Sciadanthus* et *Fraxinus*) et en 43 espèces distribuées dans la zone tempérée de l'hémisphère nord.

Au Canada, six espèces de frêne sont présentes et ont été classifiées dans l'arbre phylogénique de Hinsinger et coll. (2013) et de Kelly et coll. (2020). Dans la section *Fraxinus*, le frêne noir (*Fraxinus nigra*) est l'unique représentant en Amérique. Dans cette section, trois autres espèces sont présentes dans le monde (*F. mandshurica*, *F. excelsior* et *F. angustifolia*) ainsi que trois sous-espèces de *F. angustifolia* (ssp. *angustifolia*, ssp. *syriaca* et ssp. *oxycarpa*). Le frêne noir est le plus apparenté au frêne de Mandchourie (*Fraxinus mandshurica*), une espèce de l'Est asiatique, avec lequel il peut s'hybrider (Davidson, 1999 ; Koch et al., 2012). Le frêne bleu (*Fraxinus quadrangulata*), qui appartient à la section *Dipetalae*, est la seule espèce de cette section au Canada. Les quatre autres espèces de frênes du Canada sont regroupées dans la section *Melioides* : le frêne blanc (*Fraxinus americana*), le frêne rouge (*Fraxinus pennsylvanica*), le frêne pubescent (*Fraxinus profunda*) et le frêne de l'Oregon (*Fraxinus latifolia*).

1.2.1.2 Statut de protection

Parmi les espèces de frêne présentes au Canada, trois ont un statut d'espèce en péril selon les informations du Comité sur la situation des espèces en péril au Canada (COSEPAC; Gouvernement du Canada, 2024). Le frêne pubescent est classé en voie de disparition, car il ne reste que quelques individus. Il est menacé par l'agrile du frêne, la coupe forestière et l'agriculture. Le frêne bleu détient le statut d'espèce menacée dû à sa répartition limitée au Canada, à sa mortalité face à l'agrile du frêne, au broutage par le cerf de Virginie ainsi qu'à la fragmentation de son territoire. Le frêne noir est aussi désigné menacé en raison de l'invasion par l'agrile du frêne qui a détruit les sous-populations situées au cœur de son aire de répartition. Au niveau international, la mortalité du frêne noir dû à l'agrile du frêne a entraîné son classement en tant qu'espèce

en danger critique d'extinction sur la liste rouge de l'Union internationale pour la conservation de la nature depuis 2017 (Jerome *et al.*, 2017).

1.2.2 Menaces

Trois principales menaces pèsent sur les frênes de l'Amérique du Nord. La première est immédiate : l'agrile du frêne décime les populations nord-américaines. La seconde agit à plus long terme: les changements climatiques rendent les conditions environnementales plus hostiles nuisant à leur pérennité. Ces deux menaces agissent en synergie. L'agrile du frêne diminue fortement les populations de frênes, ce qui entraîne une perte de la diversité génétique nécessaire pour l'adaptation des espèces aux changements climatiques. Les changements climatiques rendent les conditions propices à l'établissement de l'insecte dans toute l'aire de distribution des frênes. La troisième est une menace potentielle : la chalarose du frêne. Ce champignon exotique est à l'origine d'une épidémie qui attaque sévèrement les frênes en Europe, contre lequel le frêne noir serait très vulnérable (Nielsen *et al.*, 2017).

1.2.2.1 Agrile du frêne

L'agrile du frêne (*Agrilus planipennis*) est un coléoptère spécialiste des frênes originaire d'Asie de l'Est où il est considéré comme un ravageur secondaire (Duan *et al.*, 2024). Il est arrivé au Michigan au début des années 1990 (Herms et McCullough, 2014). Le transport de bois de chauffage et de gaules infestés a permis à l'envahisseur de se répandre beaucoup plus rapidement qu'il n'aurait été capable de le faire simplement par diffusion à partir de son point d'entrée (Muirhead *et al.*, 2006). L'aire de distribution de l'insecte s'étend désormais de la côte Atlantique jusqu'au centre du Canada et des États-Unis. De plus, une première détection a été faite en Oregon en 2022 et en Colombie-Britannique en 2024 (Agence canadienne d'inspection des aliments, 2024 ; Emerald Ash Borer Network, 2024 ; U.S. Animal and Plant Health Inspection Service, 2024). À cette vitesse, l'agrile du frêne sera présent partout où il y a du frêne noir au Canada en l'espace d'une génération (60 ans; COSEPAC, 2019).

Les larves se nourrissent du cambium et du phloème laissant derrière elles des galeries qui empêchent le transport de nutriments et d'eau. Un modèle de prédiction de mortalité dans les peuplements de frênes basés sur les données récoltées au Michigan prédit la mort de 5 % des arbres en deux ans, 50 % en quatre ans et 98 % en six ans (Knight *et al.*, 2008). Les données prises dans l'épicentre de l'infestation confirment ces prédictions avec un taux de mortalité dépassant les 99 % (Klooster *et al.*, 2018). Le frêne noir est l'espèce avec le plus haut taux de mortalité en Amérique du Nord (Rebek *et al.*, 2008). Les causes de cette

différence ne sont pas encore bien élucidées, mais les publications sur le sujet convergent vers une différence de réaction face à l'infestation. Par exemple, certains travaux rapportent une plus grande latence pour reconnaître la présence des larves (Villari et al., 2016) ou des adultes (Chen et al., 2011). D'autres soulignent une plus faible expression de protéines (Whitehill et al., 2011) ou d'enzyme reliés aux mécanismes de défense (Rigsby et al., 2015). L'étude récente de Kelly et coll. (2020) a utilisé la technique de séquençage de l'ensemble du génome (*whole genome sequencing*) pour confirmer une plus faible présence de familles de gènes impliquées dans la reconnaissance et la réponse à l'insecte. Mason et coll. (2024) attribuent, pour leur part, la plus grande mortalité à une réaction excessive de l'arbre qui tue beaucoup de tissus, ce qui entraîne sa mort.

Aux États-Unis seulement, des centaines de millions de frênes ont succombé à l'agrile du frêne. Avec plus de 8,5 milliards de frênes sur leur territoire, on peut s'attendre à de grandes pertes dans les années à venir (McCullough, 2020). Les modélisations de Siegert et coll. (2023) estiment que, dans l'état actuel des choses, le frêne noir aura connu plus de 95 % de mortalité dans plus de 96 % de son aire de distribution d'ici 2045. Les coûts estimés du traitement, de l'abattage et du remplacement des frênes aux États-Unis pour la période de 2010 à 2020 sont de 12,5 milliards \$US (Kovacs et al., 2011). En plus de la mortalité due à l'agrile du frêne, l'épidémie a entraîné un abattage préventif massif en Amérique du Nord. À long terme, cette forte mortalité pourrait entraîner une perte de diversité génétique et donc une réduction du potentiel évolutif de l'espèce nécessaire pour l'adaptation des frênes aux changements climatiques (Allendorf et al., 2022).

1.2.2.2 Changements climatiques

Les changements climatiques présentent un grand défi pour la protection d'espèces menacées, car le climat joue un rôle primordial dans la distribution des organismes vivants dans le monde (Allendorf et al., 2022). La limite nordique de la distribution du frêne noir serait déterminée par un manque de degrés-jours, empêchant la maturation complète de ses graines. À l'inverse, sa limite sud résulterait d'un manque de températures froides sous le point de congélation, nécessaires à la levée de dormance des fleurs, ainsi que d'une maturation tardive de ses graines (Morin et al., 2007). La phénologie du frêne noir étant étroitement liée aux périodes de gel et de dégel, son habitat favorable pourrait être réduit de 65 % (Iverson et Prasad, 2002) à 98 % (Morin et al., 2008). De plus, les changements climatiques favoriseront la survie hivernale d'une plus grande proportion d'agrides du frêne dont la plasticité phénotypique lui permettrait déjà de survivre à des températures aussi basses que -50 °C (Duell et al., 2022). Ce à quoi s'ajoute l'augmentation

de la fréquence et de la durée des événements climatiques extrêmes, tels que les épisodes de sécheresse (Allen et al., 2010), qui fragilise les arbres et accroît leur mortalité.

Les changements climatiques peuvent affecter les populations d'une espèce différemment, et ce, en fonction de la diversité génétique disponible au sein de chacune des populations locales qui leur permettra d'avoir une réponse adéquate ou non. L'adaptation locale de certaines populations, de même que la diversité génétique sous-jacente, est en péril (Allendorf et al., 2022). L'extinction rapide de populations locales entraîne une réduction de ce potentiel évolutif essentiel à la survie de l'espèce. La connectivité entre les populations permet le transfert des variants génétiques adaptés aux nouvelles conditions environnementales pour sauvegarder les populations vulnérables au sein de l'espèce. Les modélisations de perte d'habitat favorable seraient plus pessimistes que la réalité, car ils ne prennent pas en compte l'adaptation génétique par sélection naturelle. Cela pourrait permettre à certains génotypes préalablement adaptés aux nouvelles conditions d'assurer la subsistance à long terme de l'espèce (Razgour et al., 2019).

En connaissant l'agencement gène-environnement, on peut anticiper quelles populations seront adaptées aux futures conditions climatiques. Pour ce faire, il faut documenter la diversité génétique de l'espèce, puis corrélérer les variants génétiques aux conditions actuelles. Ensuite, à l'aide de modèles de prédiction des changements climatiques, il devient possible d'identifier les régions où les populations locales seront les mieux adaptées dans le futur (Exposito-Alonso, 2023). De cette façon, les graines récoltées pour la conservation ex situ pourront être plantées aux endroits où elles seront adaptées aux conditions climatiques à venir, augmentant ainsi leurs chances de persister à long terme (Sork, 2016).

1.2.2.3 Chalarose du frêne

Une troisième menace guette le frêne noir. La chalarose du frêne, aussi appelée maladie du flétrissement du frêne, est causée par une espèce de champignon pathogène (*Hymenoscyphus fraxineus*) originaire de l'Asie de l'Est (Baral et al., 2014 ; Queloz et al., 2011 ; Zhao et al., 2012). Elle a fait son entrée en Europe par la Pologne au début des années 1990 (Przybył, 2002 ; Timmermann et al., 2011). Elle est maintenant présente dans 32 pays européens où elle ravage le frêne commun (*Fraxinus excelsior*) et le frêne à feuilles étroites (*Fraxinus angustifolia*; Marçais et al., 2022). Ce champignon se propage par diffusion dans l'air de ses ascospores et elle est responsable d'une grande mortalité dans les peuplements où elle est présente.

Une fois établie dans un peuplement, elle est considérée comme impossible à éradiquer (Gross et al., 2014 ; Pautasso et al., 2013).

L'étude de Nielsen et coll. (2017) démontre que le frêne noir est très susceptible à la chalarose du frêne. Son introduction en Amérique du Nord pourrait être la source d'une nouvelle épidémie qui viendrait s'attaquer à l'espèce qui est déjà sous la pression d'un goulot d'étranglement par l'agrile du frêne. La chalarose du frêne pourrait arriver en Amérique du Nord par l'importation de produit de frênes infestés en provenance d'Asie et d'Europe. Il est donc primordial de prendre toutes les précautions nécessaires pour ne pas introduire ce pathogène sur le continent.

1.2.3 Frêne noir

Pour mon projet de recherche, je m'intéresse plus spécifiquement au frêne noir, l'espèce la plus vulnérable à l'agrile du frêne. En plus de son importance écologique cruciale, il revêt une signification culturelle profonde pour certains peuples des Premières Nations. Il est également à noter qu'il s'agit de l'espèce de frêne la plus répandue au Canada et la seule dont la distribution est en majorité sur le territoire canadien (51 %; COSEPAC, 2019).

1.2.3.1 Importance

Le frêne noir joue un rôle écologique fondamental dans les écosystèmes humides et ripariens en influençant l'hydrologie locale par son évapotranspiration (Slesak *et al.*, 2014). Il est aussi essentiel pour plusieurs espèces spécialistes des frênes, dont le leptogé des terrains inondés, un cyanolichen menacé, ainsi que le sphinx du Canada (COSEPAC, 2019) et 43 espèces d'arthropodes (Gandhi et Herms, 2010).

Palik et coll. (2012) ont inventorié la régénération dans des peuplements où la mortalité du frêne noir est présente à des niveaux différents de sévérité. Ils concluent que les semis de frênes noirs et d'autres espèces d'arbres sont rares, tandis que les espèces arbustives sont nombreuses, ce qui risque de transformer ces milieux en arbustaies clairsemées ou en prés de graminéoïdes. Ces résultats sont corroborés par Krzemien et coll. (2024) qui ont trouvé que la hausse de la nappe phréatique, de l'humidité du sol et la diminution de l'évapotranspiration suite à la forte mortalité des frênes en milieu riparien avaient transformé l'écosystème en un milieu humide principalement constitué d'herbes et de carex. Wagner et Todd (2015) estiment que cette transformation de l'hydrologie et du biote favorisera l'établissement d'espèces invasives entraînant des changements majeurs dans l'écosystème.

L'expérimentation de Grinde et coll. (2022) dans les marécages de frêne noir appuie cette conclusion en démontrant que la mortalité induite par l'agrire du frêne risque d'entraîner un changement des communautés fauniques dans cet écosystème.

Le frêne noir est sacré pour certains peuples des Premières Nations (Costanza *et al.*, 2017) pour lesquels ils en sont descendant (Neptune *et al.*, 2015). Gabriel Frey, vannier de la Première Nation Passamaquoddy, raconte que les Wabanaki sont descendants du frêne : « Glooskap shot an arrow into an ash tree and when it split open, in the heart of the tree was Man » (Frey *et al.*, 2019, p. 147). Cette espèce est importante pour eux au niveau spirituel, culturel et économique (Benedict et Frelich, 2008). Les éclisses d'une légèreté et d'une solidité exceptionnelle sont utilisées pour la vannerie, une tradition de fabrication de panier transmise de génération en génération (Benedict et David, 2003 ; Boudreault *et al.*, 2024). La vannerie est un véhicule de transmission de la culture et de la langue et est vu aujourd'hui comme un outil de décolonisation (Neuman, 2010). Le frêne noir est aussi utilisé dans des remèdes médicaux entre autres pour des problèmes urinaires, pour le rhumatisme (Herrick, 1995) et pour des douleurs oculaires (Hoffman, 1891). Son bois a des propriétés intéressantes pour la fabrication de revêtements décoratifs, de meubles, de tonneaux (Ross, 2021) et ses propriétés mécaniques sont appréciées des luthiers pour la fabrication du corps de guitares (Ahvenainen, 2019). En 2020, l'agrire du frêne s'était déjà introduit sur le territoire de 72 % des communautés Premières Nations des États-Unis où le frêne noir est présent et il est estimé que toutes ces communautés seront affectées d'ici 2029 (Siegert et al., 2023). D'où la nécessité de prendre en compte l'importance culturelle du frêne noir dans les plans de conservation de l'espèce.

1.2.3.2 Description

La description du frêne noir remonte à 1785 par Humphry Marshall (Marshall, 1785). Selon la revue de littérature du COSEPAC (2019) des manuels sur les arbres de l'Amérique du Nord, le frêne noir est un arbre feuillu dont la hauteur à maturité varie entre 15 et 27 m et dont le diamètre oscille entre 30 et 50 cm. Ses feuilles, d'une taille de 15 à 30 cm, sont opposées, composées-pennées et ont de 7 à 11 folioles. Ses fleurs n'ont pas de pétales ni de sépales. Son fruit prend la forme d'une samare allongée et ailée. Ses racines sont étalées et peu profondes.

L'aire de distribution du frêne noir, du frêne rouge et du frêne blanc se superposent. Il est alors essentiel de savoir distinguer le frêne noir de ces deux autres espèces. Pour bien le différencier, il faut faire correspondre une combinaison de critères d'identification, car il peut être facile de faire une mauvaise

identification en se basant sur un seul critère. Le frêne noir se retrouve dans les boisés marécageux. Le frêne rouge peut se retrouver aussi bien sur des sols bien drainés qu'humides. Le frêne blanc se retrouve sur des sols secs, bien drainés et profonds. Les folioles du frêne noir sont sessiles, ceux du frêne rouge ont un petit pétiole et ceux du frêne blanc ont un pétiole marqué (Figure 2.3; Service canadien des forêts, 2015; University of Wisconsin - Green Bay, n.d.).

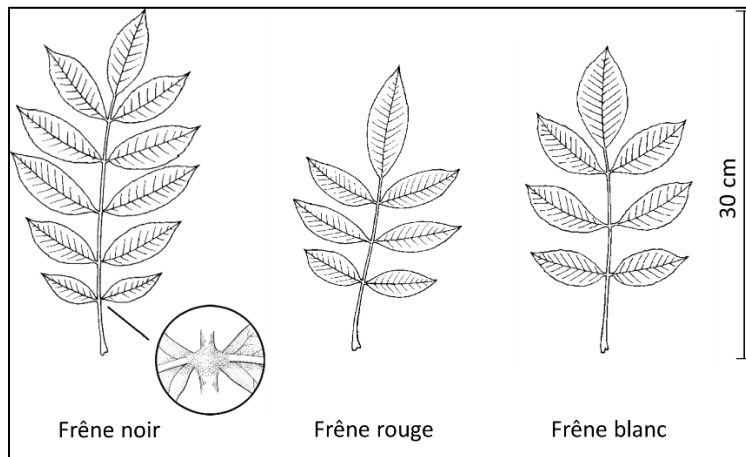


Figure 1.2 Feuilles du frêne noir, du frêne rouge et du frêne blanc

Figure réalisée à l'aide d'images tirées du Service canadien des forêts, 2015,
(<https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/famille/Fraxinus/8>)

Les cicatrices foliaires sont semi-circulaires pour les trois espèces, mais celles du frêne blanc se démarquent, car elles sont concaves ou échancrées sur le dessus (Figure 2.4; Service canadien des forêts, 2015; University of Wisconsin - Green Bay, n.d.).

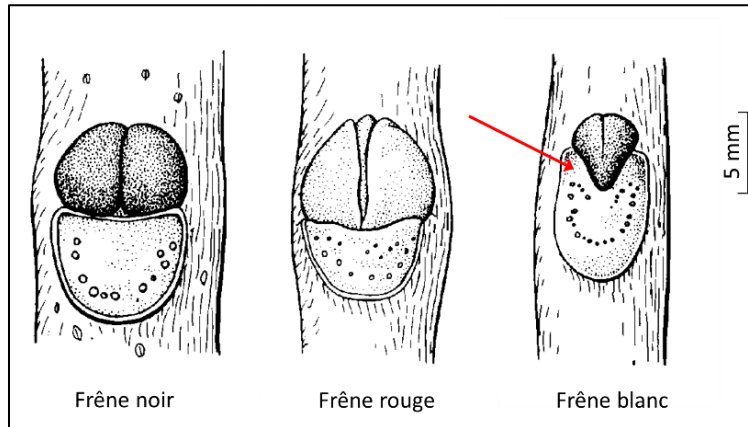


Figure 1.3 Cicatrices foliaires du frêne noir, du frêne rouge et du frêne blanc

Figure réalisée à l'aide d'images tirées du Service canadien des forêts, 2015, (<https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/famille/Fraxinus/8>)

Pour le frêne blanc et le frêne rouge, le bourgeon terminal est très près des bourgeons latéraux supérieurs. Tandis que chez le frêne noir il y a une distance claire entre le bourgeon terminal et ses bourgeons latéraux (Figure 2.5; Service canadien des forêts, 2015; University of Wisconsin - Green Bay, n.d.).

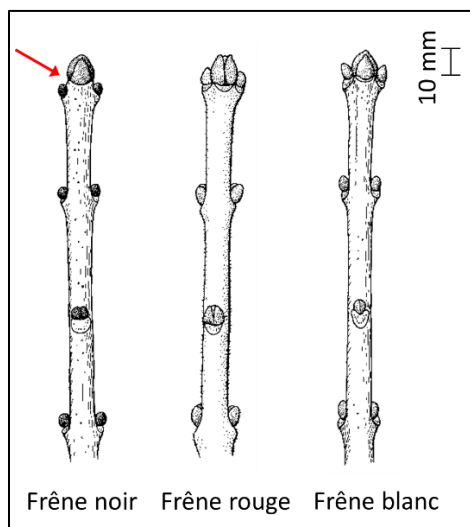


Figure 1.4 Rameaux du frêne noir, du frêne rouge et du frêne blanc

Figure réalisée à l'aide d'images tirées du Service canadien des forêts, 2015, (<https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/famille/Fraxinus/8>)

Les samares du frêne noir sont ailées jusqu'au point d'attache. Chez le frêne rouge, l'aile s'étend jusqu'à la moitié du péricarpe. Chez le frêne blanc, l'aile descend seulement un peu sous l'extrémité du péricarpe (Figure 2.6; Service canadien des forêts, 2015; University of Wisconsin - Green Bay, n.d.).

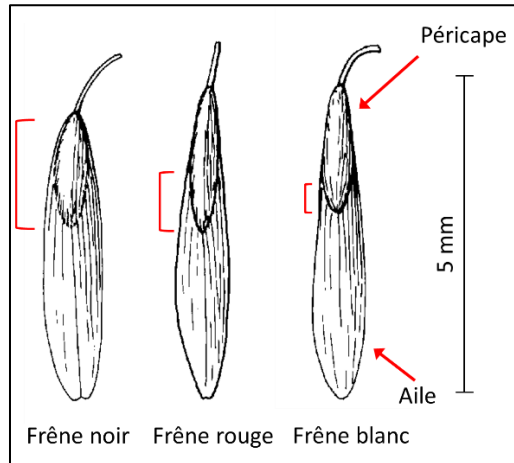


Figure 1.5 Samares du frêne noir, du frêne rouge et du frêne blanc

Figure réalisée à l'aide d'images tirées du Service canadien des forêts, 2015,
<https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/famille/Fraxinus/8>

Il est aussi à noter la présence en Amérique du Nord de deux hybrides produits au Canada dans les années 1970 entre le frêne noir et le frêne de Mandchourie nommés « Northern Treasure » et « Northern Gem ». Ceux-ci sont disponibles dans certaines pépinières en Amérique du Nord et seraient principalement utilisés en milieu urbain (Davidson, 1999). Le frêne commun a pour sa part été introduit plus abondamment sur le continent (COSEPAC, 2019). Malgré tout, sa présence reste marginale (Go Botany, 2025). Comme les critères d'identifications et les sites qu'ils peuvent coloniser recoupent ceux du frêne noir (Davidson, 1999 ; Kirtley, 2013), il est important de prélever des peuplements naturels et d'éviter les milieux urbains ou les plantations dans le cadre d'une recherche visant à documenter la diversité génétique du frêne noir à l'échelle de son aire de répartition.

Le frêne noir a une longévité moyenne de 150 ans, mais peut atteindre les 250 ans. Il commence sa production de semences entre 30 et 40 ans (Heinselman, 1981). La floraison du frêne noir varie d'un individu à l'autre. La plupart des arbres sont polygames, produisant à la fois des fleurs bisexuées et unisexuées. Certains sont cependant dioïques et ne produisent que des fleurs unisexuées (Bonner, 2008 ; COSEPAC, 2019 ; Mason *et al.*, 2024). Ils sont pollinisés par le vent (Wright, 1953), fleurissent de mai à juin (Bonner, 2008) et dispersent leurs graines du mois d'octobre au début du printemps (Sims *et al.*, 1990). Les graines des frênes peuvent parcourir 100 mètres ou plus, lorsque soufflées par le vent (Sutherland *et al.*, 2000). Celles qui restent sur l'arbre durant l'hiver, et tombent graduellement, peuvent parcourir de grandes distances sur la neige (Curtis, 1959). Elles peuvent aussi être transportées par l'eau sur des dizaines de kilomètres (Thébaud et Debussche, 1991). Sims et coll. (1990) font une description des graines :

elles sont viables pour une période de huit ans et ont une période de dormance de deux à trois ans avant de germer. C'est l'alternance de périodes chaudes et humides et de périodes froides et sèches qui leur permet de germer. Les bonnes années semencières sont espacées d'un à huit ans. Pour ce qui est de la reproduction végétative, lorsque le frêne noir est endommagé, il bourgeonne abondamment et fait des rejets de souche et de racine (Sims *et al.*, 1990).

Le frêne noir se retrouve dans les milieux où le drainage est mauvais et la nappe phréatique est haute, c'est pourquoi on le rencontre majoritairement dans les milieux humides et près des cours d'eau (Ehrenfeld, 2012 ; Sims *et al.*, 1990). Il a une tolérance intermédiaire à l'ombre et est typique du milieu ou de la fin de succession dépendamment du type de sol (Gucker, 2005). Il est présent principalement dans des peuplements mixtes, mais des peuplements purs existent aussi (Ehrenfeld, 2012).

La répartition géographique du frêne noir est la plus nordique de tous les frênes et se rend jusqu'au 50°N (COSEPAC, 2019 ; Sims *et al.*, 1990). Sa distribution au nord s'étend de Terre-Neuve au Manitoba et au sud de l'Iowa et à la Virginie (COSEPAC, 2019 ; U.S. Forest Service, 2024). Sa distribution au Canada couvre 2 millions km² sur lesquels 162 millions d'arbres sont présents (Figure 4.1; Blaney *et al.*, 2018 ; COSEPAC, 2019).

1.2.4 Solutions

L'importance écologique, culturelle et économique du frêne noir justifie de mettre en place un plan de sauvegarde de l'espèce. Mon projet de recherche s'inscrit dans cet objectif en apportant une information importante pour mener à bien ces travaux : soit de documenter sa structure génétique. Pour assurer la conservation de l'espèce, deux étapes sont requises : la conservation ex situ de ses graines et la mise en place d'un programme de croisement pour amplifier sa résistance naturelle à l'agrile du frêne.

1.2.4.1 Conservation ex situ

L'agrile du frêne entraîne un taux de mortalité élevé dans les populations infectées, faisant chuter le nombre d'individus sous le seuil de taille efficace de population nécessaire au maintien du potentiel adaptatif et à la prévention de l'érosion génétique ($N_e > 500$; Hoban *et al.*, 2020 ; Pike *et al.*, 2021 ; Woodcock *et al.*, 2018). Pour préserver la diversité génétique de l'espèce, une action rapide est essentielle.

Il est donc primordial de récolter des semences sur l'ensemble de l'aire de répartition du frêne noir et de les conserver dans des banques de graines. Une véritable course contre la montre est engagée pour sauvegarder un maximum de diversité génétique, y compris des graines d'individus potentiellement résistants à l'agrile. La collecte doit être répartie sur l'ensemble des populations, en s'appuyant sur la connaissance de la distribution hétérogène des génotypes, influencée par l'adaptation locale et la présence de groupes génétiques distincts (Namkoong, 1991 ; Pike *et al.*, 2021).

Des banques de graines bien garnies assureront la préservation à long terme d'une part significative de la diversité génétique, essentielle aux programmes de restauration de l'espèce (Volis et Blecher, 2010). Elles permettront notamment de fournir les quantités de semences nécessaires pour les programmes de croisement pour la résistance à l'agrile du frêne, pour la revitalisation des populations en déclin et pour de futurs programmes d'adaptation à de nouveaux stress.

Agir dès le début de l'épidémie en récoltant et conservant les semences maximise les chances de réintégration du frêne noir dans son écosystème et favorise sa pérennité (Namkoong, 1991 ; Pike *et al.*, 2021).

1.2.4.2 Résistance naturelle de l'hôte

Jusqu'à ce jour, lorsqu'un agent pathogène exotique fait son arrivée sur un nouveau continent, les efforts sont concentrés sur le contrôle du ravageur. Cette approche peut s'avérer efficace uniquement lorsque des actions drastiques sont entreprises dès l'introduction d'un agent pathogène exotique déjà connu. Cependant, lorsque ce dernier est établi, il est impossible de l'éliminer et il va profondément impacter l'écosystème (Pike *et al.*, 2021 ; Snieszko et Koch, 2017).

L'augmentation du commerce international, en plus de connecter les peuples, connecte les écosystèmes et fait en sorte qu'un nombre croissant d'agents pathogènes sont transmis d'un continent à l'autre (Brasier, 2008). Il devient donc primordial de trouver des solutions pour permettre la persistance des espèces fondatrices, telles que les arbres, pour assurer la pérennité des écosystèmes. Pour ce faire, des chercheurs en sciences forestières se sont tournés vers un nouveau paradigme centré sur l'arbre visant à améliorer la résistance de l'hôte (Pike *et al.*, 2021 ; Snieszko et Koch, 2017).

Cette méthode se déroule en plusieurs étapes. Il faut tout d'abord trouver des individus étant encore en santé deux ans après la mortalité de 95 % des hôtes dans le peuplement (Rosenthal et Wildova, 2024). Comme il n'y a pas eu de pression de sélection pour la résistance à l'agrile du frêne chez le frêne noir par le passé, on peut s'attendre à ne trouver qu'une résistance partielle chez quelques individus dans les populations. La résistance n'équivaut donc pas à l'immunité et elle doit être renforcée (Koch et al., 2024). Des graines ou des parties de la plante (bouture ou greffon) seront récoltées et plantées ensemble dans des plantations pour les conserver et les multiplier. Afin de vérifier leur résistance, ils seront inoculés avec l'agent pathogène en laboratoire (Snieszko et Koch, 2017). Leur degré de résistance est ensuite corrélé à leur génotype, ce qui permet de déterminer de façon probabiliste les marqueurs et l'interaction de ceux-ci reliés à la résistance. Les individus le plus résistants seront conservés et utilisés dans un processus itératif de croisement et de génotypage visant à amplifier la résistance à chaque génération jusqu'à atteindre un niveau adéquat pour être réintroduit en milieu naturel et cohabiter avec l'agent pathogène (Woodcock *et al.*, 2018). L'utilisation de la génomique rend le processus de sélection plus rapide et plus économique, car il n'est pas nécessaire d'entretenir des semis pendant plusieurs années avant de pouvoir tester leur niveau de résistance. Le potentiel de résistance de chaque semis peut être estimé dès l'apparition des premières feuilles et ne conserver que ceux avec le meilleur potentiel pour la suite du programme. Les cycles de croisement sont alors grandement accélérés (Neale et Kremer, 2011). La génomique facilite aussi la préservation de la diversité génétique nécessaire à la persistance de l'espèce face à l'émergence de nouveaux stress. Ces individus sont alors multipliés pour mettre sur pied des vergers à graines qui soutiendront l'effort de réintroduction de l'espèce (Pike *et al.*, 2021). Elle contribue également à guider le choix des sites où chaque semis devra être planté pour être adapté aux conditions environnementales présentes et futures (Exposito-Alonso, 2023). Ces projets de réintroduction doivent aussi être suivis pour mesurer leur performance et guider les stratégies futures (Woodcock *et al.*, 2018).

Ce nouveau paradigme de croisement pour favoriser la résistance naturelle de l'hôte est déjà mis sur pied avec des résultats encourageants à travers le monde chez plusieurs espèces d'arbres (Pike *et al.*, 2021 ; Snieszko et Koch, 2017). Jennifer Koch et ses collaborateurs ont entamé un tel projet sur le frêne rouge. Les semis issus du croisement de parents résistants sont jusqu'à quatre fois plus résistants à l'agrile du frêne (Popkin, 2020). Ces résultats sont d'autant plus prometteurs, car des frênes noirs présentant un niveau de résistance aussi élevé que celui du frêne rouge ont été répertoriés (Koch et al., 2024). Il est important de connaître la structure génétique de l'espèce pour s'assurer de conserver la plus grande part de la diversité génétique du frêne noir lors de ces travaux. Certains allèles peuvent être considérés comme neutres dans

les conditions actuelles, mais procurer un avantage sélectif dans des conditions futures (de Lafontaine *et al.*, 2018).

1.2.4.3 Génomique

Pour préserver une espèce menacée, il est judicieux de mettre sur pied un plan de conservation spécifique pour chacun des groupes génétiques distincts à l'intérieur de l'espèce. Cette façon de faire permet de préserver la diversité génétique (potentiel évolutif) nécessaire afin que les espèces puissent s'adapter aux changements climatiques et aux événements stochastiques futurs, et ainsi avoir plus de probabilités de persister à long terme (Allendorf *et al.*, 2022 ; Funk *et al.*, 2012). Une des premières étapes consiste donc à documenter la diversité génétique présente dans les populations naturelles au sein de l'aire de répartition de l'espèce (Godbout *et al.*, 2020 ; Gougherty *et al.*, 2020b).

Le modèle le plus simple en génétique des populations est connu sous le nom de principe d'Hardy-Weinberg. Dans ce modèle, il n'y a pas de changement génétique d'une génération à l'autre. Il n'y a donc pas de mutation, pas de migration, pas de sélection, la taille de la population est infinie et les individus se reproduisent de manière aléatoire. Cependant, dans les populations naturelles, ces cinq grands processus sont au cœur de la distribution non aléatoire des génotypes. Tout d'abord, la migration apporte de nouveaux allèles dans les populations. Puis, la dérive génétique causée par la taille finie des populations entraîne la fixation aléatoire d'allèles différents dans les populations distinctes. De plus, la sélection naturelle fait varier la prévalence des génotypes en fonction de l'environnement dans lequel chaque population évolue. Ensuite, les mutations génétiques aléatoires qui s'accumulent à l'intérieur des populations au fil des générations entraînent leur diversification. Finalement, le régime de reproduction comme la consanguinité peut entraîner un changement de la fréquence des génotypes à l'intérieur des populations, même s'il n'affecte pas les fréquences alléliques (Allendorf *et al.*, 2022 ; Wright, 1931).

La diversité génétique est souvent regroupée en deux catégories, soit la diversité génétique neutre et la diversité génétique adaptative. La diversité génétique neutre est l'ensemble de la diversité génétique qui a peu ou pas d'impact sur la valeur sélective des organismes au contraire de la diversité génétique adaptative, qui elle, a une influence sur la valeur sélective (Holderegger *et al.*, 2006). Avant de faire l'analyse des données, il est nécessaire d'identifier les marqueurs reliés à chacun des deux types de diversité génétique pour faire les analyses sur l'ensemble pertinent à la question de recherche (Allendorf *et al.*, 2022 ; Rellstab *et al.*, 2015).

1.2.4.3.1 Diversité génétique neutre

La diversité génétique neutre permet de reconstruire l'histoire évolutive et la démographie de l'espèce, ce qui est utile pour déterminer la phylogénie de l'espèce, les flux génétiques, la dérive génétique, la connectivité et la mutation (Allendorf *et al.*, 2022). Pour ce faire, il faut tout d'abord prélever des échantillons dans toute l'aire de distribution et génotyper chaque individu pour examiner les variantes génétiques de leur génome (Capblancq *et al.*, 2020).

L'une des méthodes de séquençage rapide pour obtenir les génotypes multilocus des individus échantillonnés est appelée le séquençage de l'ADN associé à un site de restriction (RADseq). En bref, cette méthode utilise des enzymes de restriction pour fragmenter l'ADN, puis les morceaux près des sites de coupe sont amplifiés par réaction en chaîne par polymérase (PCR) avant d'être séquencés afin de repérer les marqueurs polymorphiques. Le RADseq comprend diverses méthodes, ce qui inclut le génotypage par séquençage (GBS; Allendorf *et al.*, 2022 ; Elshire *et al.*, 2011). Les polymorphismes mononucléotidiques (*single nucleotide polymorphism*; SNP) représentent le polymorphisme le plus fréquent au sein du génome. Leur abondance et leur présence répartie à travers le génome en font des indicateurs précieux pour étudier la variation génétique dans les populations naturelles (Allendorf *et al.*, 2022).

Une fois les SNP répertoriés, les F-statistiques (Wright, 1951) sont des tests statistiques utilisés pour déterminer si la différence entre les fréquences génotypiques des populations inventoriées est significativement différente de ce qui est attendu sous l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Ces tests sont utiles pour décrire la structure génétique au sein d'une espèce en se basant sur les populations qui la composent. Le F_{IT} permet de déterminer la diversité totale à l'intérieur de l'espèce en la comparant à l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Cette proportion est attendue dans une population théorique qui n'a pas de migration, où les individus se reproduisent au hasard, sont en nombre infini, n'ont pas de mutation et ne sont pas soumis à la sélection naturelle. Le F_{IS} mesure l'écart par rapport à l'équilibre d'Hardy-Weinberg à l'intérieur d'une population (Allendorf *et al.*, 2022 ; Holsinger et Weir, 2009). En d'autres mots, il représente son coefficient de consanguinité. Cette information permet, entre autres, de savoir si certaines populations présentent un risque de dépression de consanguinité et sont exposées à un danger accru d'extinction. Le F_{ST} mesure la divergence entre les populations (Allendorf *et al.*, 2022 ; Holsinger et Weir, 2009) permettant ainsi de déterminer s'il y a des groupes génétiques différents à l'intérieur d'une espèce.

Une autre approche consiste à se baser sur les individus de l'espèce plutôt que sur les populations qui la composent. En procédant ainsi, on n'utilise pas de regroupement a priori des individus en populations distinctes. Les analyses se font sur les données brutes du génotype de chaque individu. L'utilisation de méthodes probabilistes dans les logiciels STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) et ADMIXTURE (Alexander *et al.*, 2009) permettent de diviser les individus en sous-groupes selon les fréquences alléliques obtenues à l'aide de marqueurs génétiques. Elles permettent aussi de déterminer la contribution génétique de plusieurs groupes au sein d'un individu (Novembre, 2014). Les résultats des modèles utilisés dans ces logiciels permettent d'estimer le nombre le plus vraisemblable de groupes différents qui composent l'espèce. Bien que ces modèles représentent une simplification de la réalité et ne tiennent pas compte des processus évolutifs complexes ayant affecté l'espèce, ils fournissent des informations précieuses (Novembre, 2014).

1.2.4.3.2 Diversité génétique adaptative

Pour sa part, la diversité génétique adaptative découle de l'adaptation des populations à leur environnement (Capblancq *et al.*, 2020). En fonction de la force de la pression de sélection environnementale, le changement des fréquences alléliques se fera plus ou moins rapidement chez la population touchée (Allendorf *et al.*, 2022). Il est important de décrire les variations génétiques adaptatives afin d'anticiper la capacité d'adaptation aux changements climatiques (Grummer *et al.*, 2019). De plus, l'utilisation de cette information permet une prédiction plus précise de l'aire de distribution future de l'espèce (Razgour *et al.*, 2019). La détection de milliers de marqueurs génétiques tout au long du génome est rendue possible grâce aux nouvelles technologies de séquençage et permet de détecter, au niveau génétique, l'impact de changements même subtils dans l'environnement (Allendorf *et al.*, 2022). Les données récoltées dans le cadre de cette maîtrise permettront à un projet de recherche ultérieur d'analyser la diversité adaptative du frêne noir. Pour bien comprendre le potentiel et l'importance de ces données, une brève introduction à ce volet est détaillée dans les paragraphes suivants.

Trois approches complémentaires peuvent être utilisées afin de repérer les marques génétiques laissées par les différentes adaptations locales. Ces méthodes facilitent l'identification des populations prioritaires à conserver pour préserver la diversité adaptative permettant à l'espèce de s'adapter aux conditions futures. La première utilise le test des valeurs aberrantes (F_{ST} outlier test) pour détecter les marqueurs présentant une divergence des fréquences alléliques plus élevée que celle attendu du simple effet du hasard entre les populations. Cette différence indique que ces marqueurs subissent des pressions de

sélection distinctes entre les populations (Bonin, 2008 ; Luikart *et al.*, 2003 ; Storz, 2005). L'avantage de cette méthode est la possibilité de détecter des marqueurs sous sélection sans se limiter à ceux ayant un lien avec des paramètres environnementaux (Luikart *et al.*, 2003). Cependant, il convient d'être prudent dans l'interprétation des valeurs de F_{ST} , car plusieurs facteurs additionnels, distincts de la sélection, peuvent avoir un impact sur ce paramètre (Bierne *et al.*, 2013 ; Hoban *et al.*, 2016 ; Lotterhos et Whitlock, 2015).

La deuxième approche consiste à utiliser le test d'association génotype-environnement (GEA) pour corrélér les fréquences alléliques avec des variables environnementales comme les précipitations ou la température. Cette association augmente la force du test en permettant d'associer la sélection avec des variables environnementales utiles pour l'adaptation aux changements climatiques. Il est crucial de choisir une échelle temporelle et spatiale adéquate pour celles-ci. Il est important de rappeler que ce test permet de trouver un lien de corrélation et non un lien de causalité (Forester *et al.*, 2018 ; Rellstab *et al.*, 2015). Le test d'association génotype-environnement est issu de l'approche génomique du paysage qui corrèle des données génétiques avec celles de l'écologie du paysage. La combinaison de ces deux types de données permet des analyses plus fines de la structure génétique et des liens qui l'unissent avec l'environnement dans lequel elle évolue (Allendorf *et al.*, 2022). Cette méthode renforce ainsi notre compréhension de l'évolution et l'écologie des espèces, ce qui est particulièrement utile pour mettre sur pied des plans de conservation efficaces.

La troisième approche, mise de l'avant dans la revue de littérature de Capblancq et coll. (2020), est l'étude d'association pangénomique (*genome-wide association studies*; GWAS). Cette méthode permet d'identifier les liens génotype-phénotype et de comprendre sur quels traits fonctionnels se fait la sélection. Les SNP dont la valeur sélective diffère en fonction du milieu sont identifiés lors des tests d'associations génotypes-environnement et sont utilisés pour généraliser le lien entre génotype et environnement à travers le paysage. En utilisant cette association dans différentes projections climatiques, il est possible de fournir une estimation continue de l'inadéquation entre le génotype adapté localement et le climat futur. Les résultats obtenus étant basés sur des simplifications statistiques, la dernière étape consiste à valider ceux-ci à l'aide de jardins communs, d'expériences en environnement contrôlé ou de données historiques. Les connaissances ainsi acquises peuvent être intégrées dans un programme de restauration de l'espèce et permettent de s'assurer que l'espèce soit adaptée aux conditions environnementales des sites où elle est présente (Capblancq *et al.*, 2020).

1.2.4.3.3 Diversité génétique du frêne noir

La variation génétique d'une espèce observée à travers son aire de distribution est le reflet de l'évolution passée de l'espèce (génétique neutre) ainsi que de l'adaptation locale des populations à l'environnement où elle est située (génétique adaptative). Il est attendu qu'il y ait une bonne connectivité génétique entre les peuplements de frêne noir et par conséquent une faible différenciation génétique entre eux. Une première raison est que le frêne noir est une espèce anémophile. Le pollen des arbres peut s'élever jusqu'à 3 km d'altitude et être transporté sur 1 000 km avec des vents de 30 km/h (Robichaud & Comtois, 2021). Tauber (1965) estime que la moitié du pollen se dépose dans les premiers 250 m, que les trois quarts se déposent dans les premiers 5 km et que 3 % parcourent des distances entre 100 et 200 km. Une seconde raison est la grande distance que les graines peuvent parcourir sur la neige et sur l'eau. Elles pourraient même traverser les Grands Lacs (COSEPAC, 2019).

Simpson et coll. (2008) ont analysé la variation alloenzymatique à huit locus à l'échelle de l'aire de distribution canadienne et ont trouvé que la différence entre les sites était responsable de seulement 3,6 % de la diversité génétique totale chez le frêne noir. C'est un résultat similaire à ceux trouvés chez plusieurs autres arbres pollinisés par le vent. Ce mode de reproduction entraîne beaucoup d'échanges génétiques entre les populations. Selon le Département de l'agriculture et le Service de conservation des ressources naturelles des États-Unis (2006), il n'y a pas de variété ou de sous-espèce reconnue au sein du frêne noir.

L'histoire évolutive du frêne noir n'a pas encore été étudiée. C'est pourquoi j'ai fait une revue de littérature sur d'autres espèces de feuillus de la forêt tempérée dont l'aire de répartition chevauche celle du frêne noir et pour lesquelles une publication sur leur phylogéographie est disponible. Dans la littérature scientifique, on retrouve deux hypothèses dominantes (non exclusives) qui expliqueraient la répartition des grands groupes génétiques à travers l'aire de répartition d'une espèce.

D'une part, il y a l'hypothèse que des groupes génétiques distincts se seraient formés dans des refuges glaciaires occupés par différentes populations qui ont été isolées pendant des millénaires et qui ont recolonisé le territoire par la suite. Cette recolonisation aurait entraîné une diminution de la diversité génétique vers le nord. Une signature génétique serait tout de même toujours perceptible à ce jour entre les populations issues des différents refuges glaciaires (Gougherty *et al.*, 2020a).

D'autre part, l'hypothèse centre-périphérie se base sur la distribution actuelle de l'espèce. Elle prédit que la diversité génétique est plus élevée au centre de son aire de répartition, là où les conditions environnementales sont optimales et où l'abondance de l'espèce est la plus grande. La diversité génétique diminue progressivement en s'éloignant du centre vers la périphérie, en raison d'événements fondateurs et de la plus faible densité des populations périphériques (Gougherty *et al.*, 2020a).

Les deux hypothèses se basent sur l'impact génétique des événements fondateurs. Certains auteurs tracent des liens avec l'une ou l'autre de ces hypothèses en fonction de la distribution spatiale des groupes génétiques de l'espèce sur laquelle ils ont travaillé. Malgré les débats persistants quant à laquelle des deux hypothèses explique le mieux les groupes génétiques que l'on retrouve au sein d'une espèce, les points de vue convergent sur le fait que la structuration génétique spatiale est influencée par leur mode de reproduction, leur histoire démographique et leur environnement.

Jusqu'à maintenant, la structure génétique d'une seule espèce de frêne de l'Amérique du Nord a été publiée. Huff et coll. (2022) ont déterminé la structure génétique du frêne rouge (*Fraxinus pennsylvanica*) à l'aide de 85 individus représentant 56 provenances couvrant l'aire de distribution de l'espèce. Les résultats de l'étude démontrent la présence de deux groupes génétiques, l'un à l'ouest et l'autre au sud-est des Grands Lacs avec une zone de contact entre les deux dont une partie est située sur les Appalaches. Les auteurs postulent que cette structure génétique serait le résultat de deux refuges glaciaires, l'un dans l'est et l'autre dans l'ouest de l'aire de distribution de l'espèce (Figure 1.6a).

Parmi les autres espèces d'arbres feuillus présentes dans la forêt tempérée du nord-est de l'Amérique du Nord, la structuration génétique spatiale a été mesurée sur sept d'entre elles dont : le noyer cendré (*Juglans cinerea*; Schumacher *et al.*, 2022), le hêtre à grandes feuilles (*Fagus grandifolia*; Kitamura & Kawano, 2001), l'érable à sucre (*Acer saccharum*; Vargas-Rodriguez *et al.*, 2015), le cerisier tardif (*Prunus serotina*; Konrade, 2017), le peuplier baumier (*Populus balsamifera*; Keller *et al.*, 2010 ; Meirmans *et al.*, 2017), le peuplier deltoïde (*Populus deltoides*; Godbout *et al.*, 2020) et le peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*; Goessen *et al.*, 2022). Les grandes tendances qu'on peut en tirer c'est que le nombre de groupes génétiques varie de deux, pour les espèces dont l'aire de répartition est plus restreinte, tel le noyer cendré, à quatre pour les espèces dont l'aire de distribution couvre l'Amérique du Nord comme le peuplier faux-tremble. Le cerisier tardif fait cependant exception où un seul groupe génétique a été trouvé.

Globalement, la comparaison de la structuration génétique spatiale de ces huit espèces fait ressortir un patron : la présence de deux groupes génétiques reliés à deux refuges glaciaires situés de part et d'autre des Appalaches. Ces deux groupes génétiques auraient emprunté deux routes différentes de recolonisation vers le nord et des individus au génotype intermédiaire seraient apparus au chevauchement de ces deux routes migratoires. La revue de littérature de Jaramillo-Correa et coll. (2009) va dans le même sens en mettant de l'avant l'hypothèse du rôle des Appalaches dans la discontinuité génétique de certaines espèces d'arbres de l'est de l'Amérique du Nord (Figure 1.6b).

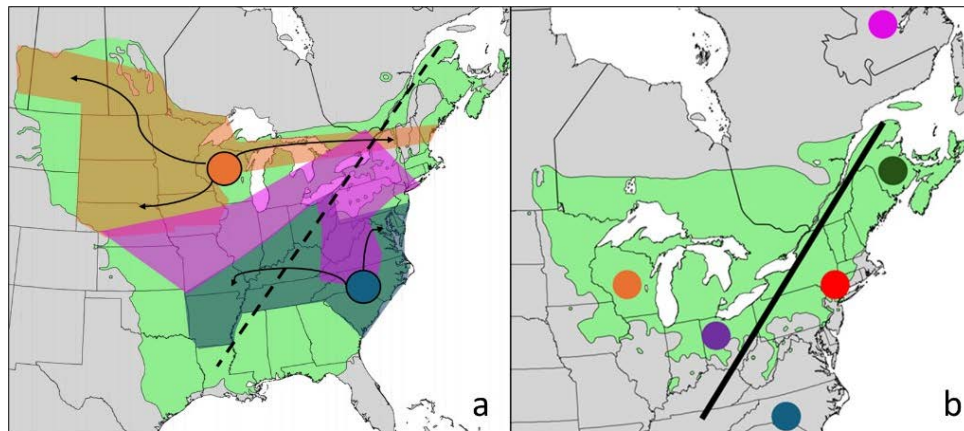


Figure 1.6 a) Présence de deux groupes génétiques chez le frêne rouge avec une large zone d'introgression entre les deux, séparés par les Appalaches, suggérant la présence de deux refuges glaciaires distincts (d'après Huff *et al.*, 2022). b) Patrons convergeant de distribution génétique chez les arbres de l'Amérique du Nord qui coïncident avec des chaînes de montagnes telles les Appalaches ainsi que des refuges glaciaires potentiels (d'après Jaramillo-Correa *et al.*, 2009)

Adaptée de [Aire de distribution naturelle du frêne noir], par U.S. Geological Survey, 1999, Wikimedia.
(https://fr.wikipedia.org/wiki/Fr%C3%AAne_noir#/media/Fichier:Fraxinus_nigra_range_map_3.png). CC-PD-Mark

1.3 Hypothèse de travail

L'objectif de mon projet de recherche est de mieux comprendre la structure génétique présente chez le frêne noir dans toute son aire de distribution. Pour l'atteindre, je vais tester l'hypothèse suivante : il existe deux groupes génétiques au sein du frêne noir, séparés par les Appalaches, soit l'un autour des Grands Lacs et l'autre sur la côte Est avec une zone d'introgression (Figure 1.7). Ce postulat se base sur la structuration génétique spatiale trouvée chez d'autres espèces d'arbres feuillus de la forêt tempérée du nord-est de l'Amérique du Nord. L'isolement géographique d'une population de frêne noir à l'ouest et à l'est des Appalaches lors du dernier maximum glaciaire a eu un impact génétique encore perceptible à ce jour et cette espèce est divisée en deux groupes génétiques.

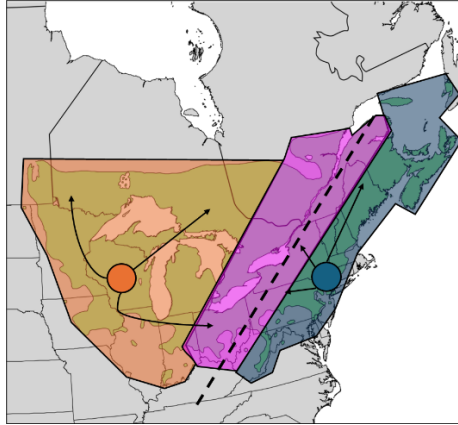


Figure 1.7 Hypothèse : présence de deux groupes génétiques homogènes séparés par les Appalaches avec une zone d'introgression entre les deux

Adaptée de [Aire de distribution naturelle du frêne noir], par U.S. Geological Survey, 1999, Wikimedia.
https://fr.wikipedia.org/wiki/Fr%C3%AAnne_noir#/media/Fichier:Fraxinus_nigra_range_map_3.png. CC-PD-Mark

CHAPITRE 2

ECHOES OF THE APPALACHIANS: GENETIC STRUCTURE OF A THREATENED TREE SPECIES ACROSS EASTERN NORTH AMERICA

Pier-Alexandre Grenier¹, L. Touchette², K. LoPiccolo³, J. Hamilton³, N. Isabel², Y. Surget-Groba¹

¹Département des Sciences Naturelles, Université du Québec en Outaouais, Ripon, QC, Canada

²Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Center, Québec, QC, Canada

³Department of Ecosystem Science and Management, Pennsylvania State University, State College, Pennsylvania, USA

2.1 Abstract

The biodiversity crisis is severely impacting forests, key ecosystems where many species are in decline. Black ash (*Fraxinus nigra*), a critically endangered species, is experiencing a mortality rate exceeding 99% due to the emerald ash borer (*Agrilus planipennis*), the most damaging invasive insect in North American forests. A species of cultural significance to some Indigenous Nations, its disappearance would cause major disruptions in wetland and riparian ecosystems. Given the inevitable spread of the emerald ash borer, a targeted seed collection effort is urgently needed to preserve the genetic diversity essential for the species' adaptation to climate change.

Understanding the genetic structure of black ash is crucial to guiding these conservation efforts, yet no study has been published on this topic. In this research, we documented the species' genetic structure using samples collected across Canada and the United States, covering most of its distribution range. These samples were analysed using genotyping-by-sequencing (GBS). The analyses consistently revealed four genetic groups within black ash. Two main groups are located in the eastern and western parts of the distribution, separated by the Appalachian Mountains with a genetic gradient between them. In addition, two isolated genetic groups were identified: one in Wisconsin and one in Gaspereau, Nova Scotia.

This study represents a critical first step toward preserving black ash genetic diversity before extinction occurs. Seed collection efforts must now urgently target these four distinct genetic groups to preserve the genetic material essential for resistance breeding and future restoration efforts, ensuring the species' survival beyond the emerald ash borer crisis.

Keywords: species conservation and restoration, population genomics, black ash

2.2 Introduction

Biodiversity is the foundation upon which human society depends; not only to meet its basic needs, but also for its long-term prosperity (McNeely *et al.*, 1990). Humans have transformed an estimated 45% of terrestrial ecosystems since 1850 (Exposito-Alonso, 2023) and are believed to be driving the sixth mass extinction (Ceballos *et al.*, 2015). Unlike past mass extinction events, which typically unfolded over tens of thousands to millions of years, the current one may occur over a period of just 200 years. By 2100, up to 50% of species could disappear, and the recovery of the biosphere could take millions of years (Myers, 1993 ; Singh, 2002). The primary causes of global biodiversity loss, in decreasing order of impact, are habitat loss, overexploitation, invasive species, and climate change (Maxwell *et al.*, 2016).

Trees are keystone species in forest ecosystems, supporting a wide range of plant and animal life (Hämäläinen *et al.*, 2023). However, for a variety of reasons including the introduction of novel pathogens, the percentage of tree species threatened with extinction has risen from 10% in 1998 (Williams, 1998) to 38% in 2024 (International Union for Conservation of Nature, 2024). At least 142 tree species are now extinct in the wild (Botanical Gardens Conservation International, 2021). The number of pathogens invading forests worldwide continues to grow. The severe mortality caused by some of these organisms is often due to a lack of coevolution, and therefore a lack of host resistance mechanisms (Brockerhoff et Liebhold, 2017). Chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*), Dutch elm disease (*Ophiostoma ulmi*), and white pine blister rust (*Cronartium ribicola*) are three such pathogens that have already reshaped forest composition in North America (Pike *et al.*, 2021; Snieszko and Koch, 2017).

More recently, the emerald ash borer (*Agrilus planipennis*) has invaded North America. This insect, native to Eastern Asia, was first detected in Michigan in the early 1990s (Hermes and McCullough, 2014). A specialist feeder on ash trees (*Fraxinus spp.*), it has killed over 99% of the genus at the epicenter of the invasion (Klooster *et al.*, 2018). However, because the insect is now well established across the continent, eradication is no longer feasible (Hermes and McCullough, 2014). To date, it is considered the most destructive non-native insect introduced to North American forests (Popkin, 2020). The high mortality rate among ash trees poses a serious threat to their genetic diversity, which is essential for their long-term survival.

We chose to focus on black ash (*Fraxinus nigra*), the most vulnerable ash species to the emerald ash borer (Kelly *et al.*, 2020; Showalter *et al.*, 2020). It has been classified as critically endangered by the IUCN since

2017 (Jerome *et al.*, 2017). Black ash plays a vital ecological role in the wetland and riparian ecosystems of Eastern North America where it occurs (Ehrenfeld, 2012; Sims *et al.*, 1990). It is also a sacred species for certain First Nations communities (Costanza *et al.*, 2017), and its disappearance would bring major changes to the ecosystems it supports (Wagner and Todd, 2015). Immediate action is thus critical to ensure the preservation of this species so that it can continue to fulfill both its ecological and cultural roles.

To conserve a threatened species effectively, it is important to develop conservation plans specific to each genetic clusters within the species. This approach helps preserve genetic diversity, which is key to its evolutionary potential and ability to adapt to global changes and future stochastic events (Allendorf *et al.*, 2022; Funk *et al.*, 2012). Resistance to the emerald ash borer or adaptation to climate change are processes that must happen fast for the survival of the species. As black ash is a widespread species with a long generation time, it has probably accumulated a lot of genetic diversity over its 45.4 million years of existence (Hinsinger *et al.*, 2013), most of which is neutral. Since the accumulation of new mutations is a slow process, the adaptation and survival of the species will depend mostly on the standing genetic variation (Barrett and Schluter, 2008). Some alleles may appear neutral, but may offer selective advantages under new conditions (de Lafontaine *et al.*, 2018). One of the first steps in this process is to characterize the genetic structure of natural populations across the species' range (Godbout *et al.*, 2020; Gougherty *et al.*, 2020b).

Most species exhibit genetic structure, and the spatial arrangement of their genetic lineages is linked to evolutionary processes driven by biogeographical context. Physical barriers to gene flow between populations over a long evolutionary period promote the genetic structuring of species. Such historical barriers have shaped the genetic patterns of continental biotas. This was the case during the Last Glacial Maximum, when populations of species were forced into different glacial refugia, often separated by mountain ranges or rivers (Avice, 2009). This isolation permitted genetic differentiation to accumulate. The retreat of the ice sheet enabled populations to recolonize the continent and reestablished gene flow between previously isolated populations. In Eastern North America, multiple species show similar patterns of genetic discontinuity related to the Appalachian Mountains and glacial refugia (Jaramillo-Correa *et al.*, 2009).

In this research, we documented the genetic structure of black ash across its entire range. Our hypothesis was that the species harbours two main genetic groups, separated by the Appalachian Mountains: one

centered around the Great Lakes and the other along the East Coast, with a zone of introgression (gene flow between clusters). This assumption is based on spatial genetic structure patterns observed in other broadleaf tree species of Eastern North American temperate forest (*Acer saccharum*, Vargas-Rodriguez *et al.*, 2015; *Fagus grandifolia*, Kitamura and Kawano, 2001; *Fraxinus pennsylvanica*, Huff *et al.*, 2022; *Juglans cinerea*, Schumacher *et al.*, 2022; *Populus balsamifera*, Keller *et al.*, 2010 ; Meirmans *et al.*, 2017; *Populus deltoides*, Godbout *et al.*, 2020; *Populus tremuloides*, Goessen *et al.*, 2022; *Prunus serotina*, Konrade, 2017). The geographic isolation of black ash populations east and west of the Appalachians during the Last Glacial Maximum likely left a genetic signature that remains detectable today, resulting in two distinct genetic groups.

This information is important for guiding conservation efforts for black ash. It will help guide seed collection programs aimed at the *ex situ* conservation of the species' genetic resources in the form of seed banks (Natural Resources Canada, 2025). This strategy will ensure the long-term preservation of a significant portion of its genetic diversity (Di Santo and Hamilton, 2021).

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Sampling

The samples used in this study, consisting of two leaflets per tree, were assembled by the National Tree Seed Center (NTSC-NRCan), the technical team at the Laurentian Forestry Centre (LFC-NRCan), Pennsylvania State University, and their collaborators. These samples were opportunistically collected between 2016 and 2023 across the full distribution range of black ash in Canada and along the latitudinal gradient in the USA, aiming to capture most of the species' genetic diversity. Within stands, sampled trees were sparsely distributed to minimize the risk of sampling close relatives. Samples were stored in envelopes, placed in airtight bags with silica gel packets, and kept at ambient room temperature, following the protocol described in the Supplementary Information (Methods S1).

The dataset includes 613 samples in total. Metadata for all samples is provided in the Supplementary Information (Dataset S1). In Canada, 457 samples were collected. A GPS point was recorded for most individuals, allowing each to be treated as a distinct sampling site. For some individuals, however, a single GPS point was recorded for a group of nearby individuals. These were grouped by locality, resulting in 44 single-individual sites and 64 populations averaging 11 individuals each (min: 2, max: 29). In the USA, 156

samples were collected. Since each stand was recorded with a single GPS point, each was treated as one population. Across eight populations, an average of 20 individuals were sampled (min: 16, max: 20).

2.3.2 DNA Processing

DNA was extracted using the NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Allentown, PA, USA) according to the protocol detailed in Supplementary Information (Methods S2). Genomic libraries were prepared using double-digest restriction-site associated DNA sequencing (ddRADseq) protocol per Parchman *et al.* (2012) at the Institute for Integrative Biology and Systems (IBIS) at Laval University. Genomic DNA was digested using EcoRI and MseI endonucleases (New England BioLabs, Inc). T4 DNA ligase (New England BioLabs, Inc) was then used to ligate uniquely barcoded Illumina adaptors to the EcoRI cut sites of fragments, and standard Illumina adaptors to the MseI cut sites. Barcoded fragments were amplified via PCR and size selected within the range of 350 to 450 bp. Pooled libraries were sent to the University of Connecticut for sequencing. Paired-end sequencing of 150 bp read lengths was performed on the Illumina NovaSeq 6000 platform in an S4 flow cell.

2.3.3 Bioinformatics

The different steps used for bioinformatics are available on GitHub at <https://github.com/eeglab-uqo/blackAsh>. Demultiplexing of sequence files by individual was performed using Stacks (Catchen *et al.*, 2013), which was also used to correct barcode sequencing errors. Reads were trimmed, filtered, and assembled *de novo* using the procedure detailed in 'dDocent' v2.7.8 (Puritz *et al.*, 2014). Briefly, Trimmomatic removed bases with a quality score less than 20 from the beginning and ends of reads and removed Illumina adaptors. Then, CD-HIT clustered reads into contigs based on within individual coverage, presence across individuals, and overall sequence similarity (cutoffs: individual = 3, coverage = 3, similarity = 0.85). The trimmed reads were mapped to a *de novo* reference assembly created from the trimmed reads using the 'bwa-mem' tool with default parameters (match = 1, mismatch penalty = 4, gap penalty = 6). Sequence variants were identified using 'bcftools' (Danecek *et al.*, 2021) with the initial filtering criteria: biallelic SNP present within at least 50% of individuals, quality score > 30, read depth > 3, and minor allele count > 3. Individuals missing more than 40% of the identified SNP were removed from the dataset. Additional stringent filtering was applied using the following parameters: maximum missingness of 10% per SNP, and minor allele frequency (MAF) ≥ 0.05 .

During data exploration, additional quality control was performed through the analysis of observed heterozygosity (H_o) values. Individuals exhibiting outlier heterozygosity ($H_o < 0.1$ or $H_o > 0.4$) were excluded, as they were considered not to be black ash. The remaining samples were processed through the standard pipeline for read trimming, filtering, and assembly as detailed previously. Principal Components Analysis (PCA) revealed systematic clustering along PC1 corresponding to sequencing plates, indicating a batch effect (Figure S1). Although samples had been randomized across plates during library preparation, this systematic bias required correction to prevent confounding biological signal. To identify and remove batch-associated SNP, the approach outlined in the MarineOmics tutorial was followed (Silliman et Davenport, 2022). Briefly, SNP loadings for each principal component were calculated, and those contributing most strongly to PC variation were identified as potentially batch-affected. The distribution of absolute PC loadings was examined using a histogram to determine an appropriate filtering threshold. A cutoff of 0.005 for absolute PC loadings was necessary to effectively remove the batch effect while retaining biologically informative variants (Figure S2). SNP exceeding this threshold were filtered from the dataset, and a new VCF file was generated for downstream analyses.

2.3.4 Data Analysis

The different steps used for data analysis are available on GitHub at <https://github.com/eeglab-ugo/blackAsh>. All analyses were conducted in R Statistical Software (v4.4.2; R Core Team, 2024) using Rstudio (v2024.12.0-467; RStudio Team, 2024), except for the ADMIXTURE analyses. Genetic structure was first assessed using PCA with the 'dartR' package (v2.7.2; Gruber *et al.*, 2018). Model-based ancestry estimates were then obtained with ADMIXTURE (v1.3.0; Alexander *et al.*, 2009). F-statistics and inbreeding coefficients (F_{IS}) were calculated using the 'Hierfstat' package (v0.5-11; Goudet, 2005), while pairwise F_{ST} values were computed with the 'StAMPP' package (v1.6.3; Pembleton *et al.*, 2013).

2.4 Results

2.4.1 Sequencing results

GBS library preparation and sequencing of the 613 samples generated an initial dataset of 6,432,500 raw SNP. Sequential bioinformatic filtering substantially reduced the dataset to 15,611 high-quality SNP across 471 individuals (Table 2.1). Quality control identified 15 individuals with outlier observed heterozygosity values, suggesting potential species misidentification. Eleven of these outliers originated from Saskatchewan, outside the natural distribution range of black ash. The remaining four outliers originated

from different populations, but since other samples from these populations remained, their genetic information was still represented in the analyses. Principal Component Analysis revealed a systematic batch effect corresponding to sequencing plates despite sample randomization during library preparation. Batch correction was applied to remove this technical artifact before downstream analyses.

Table 2.1 Sequential filtering steps applied to GBS data showing sample and SNP retention at each bioinformatic stage

Filtering Parameter	# of Samples	# of SNP
Before filtering	613	6,432,500
Biallelic SNP	613	4,852,752
Genotype Quality > 30	613	2,557,048
Minimum read depth > 3, Minor Allele Count > 3	613	1,255,337
Individuals $\geq$ 60 % SNP	486	1,255,337
Missingness < 50%	486	315,463
Missingness < 10%, MAF 0.05	486	16,554
Individuals: $0.1 \leq H_o \leq 0.4$	471	19,397
Batch-associated SNP	471	15,611

2.4.2 Genetic Structure

The genetic structure of black ash was examined using ADMIXTURE and PCA, exploring models with one to ten genetic clusters. First, the number of genetic clusters (K) for which ADMIXTURE has best predictive accuracy was calculated with the cross-validation error (CV) integrated with the software and then plotted (Figure S3). This method indicates that the best model is K = 2, but the range of the CV is quite narrow (0.45910 to 0.47260), with a difference of only ~0.013 between the minimum (K = 2) and maximum (K = 10). This small suggested that additional exploration was needed to identify the optimal clustering model. Therefore, we subsequently analyzed the ADMIXTURE barplots for K = 1 to 10 (Figure S4), the spatial distribution of the genetic structure on the landscape (Figure 2.1 and S6), compared these results with PCA analyses (Figure 2.2), and considered the biogeographical history of the study area. The highest convergence between methods supported a four-cluster model (Figure S5). This model revealed two main genetic clusters: one in the eastern and one in the western part of the species' range, separated by the Appalachian Mountains, with a genetic gradient between the far east and far west populations, along with two isolated clusters: one in Wisconsin and one in Gaspereau, Nova Scotia. The first PCA axis explains 1% of the genetic variation, while the second axis explains 0.7% (Figure 2.2). The Wisconsin cluster appears to be the most genetically distinct, further supporting its isolation.

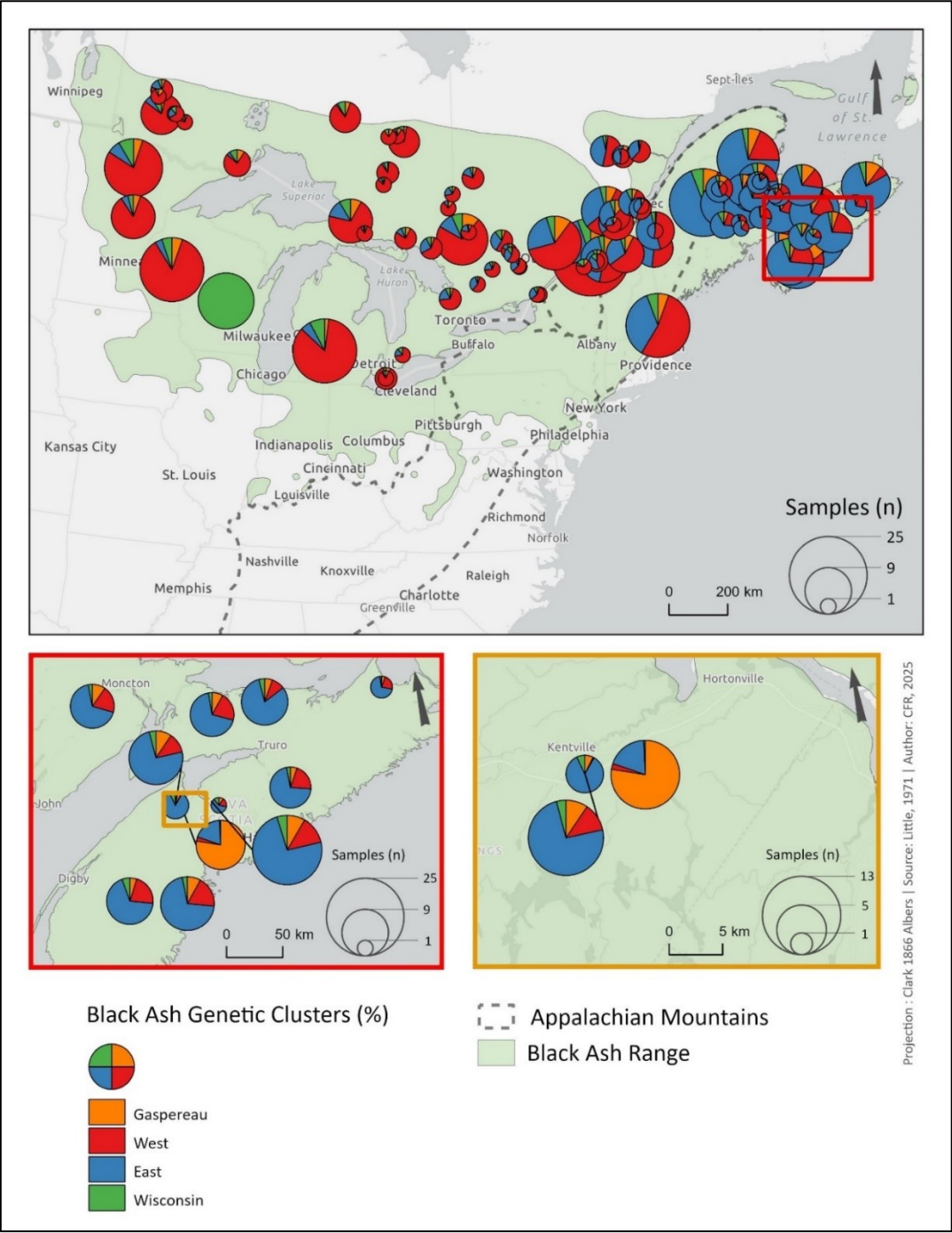


Figure 2.1 Distribution of black ash genetic clusters. Four clusters were identified: East, West, Wisconsin and Gaspereau (Nova Scotia). Each pie chart represents the average proportion of each genetic cluster within a population

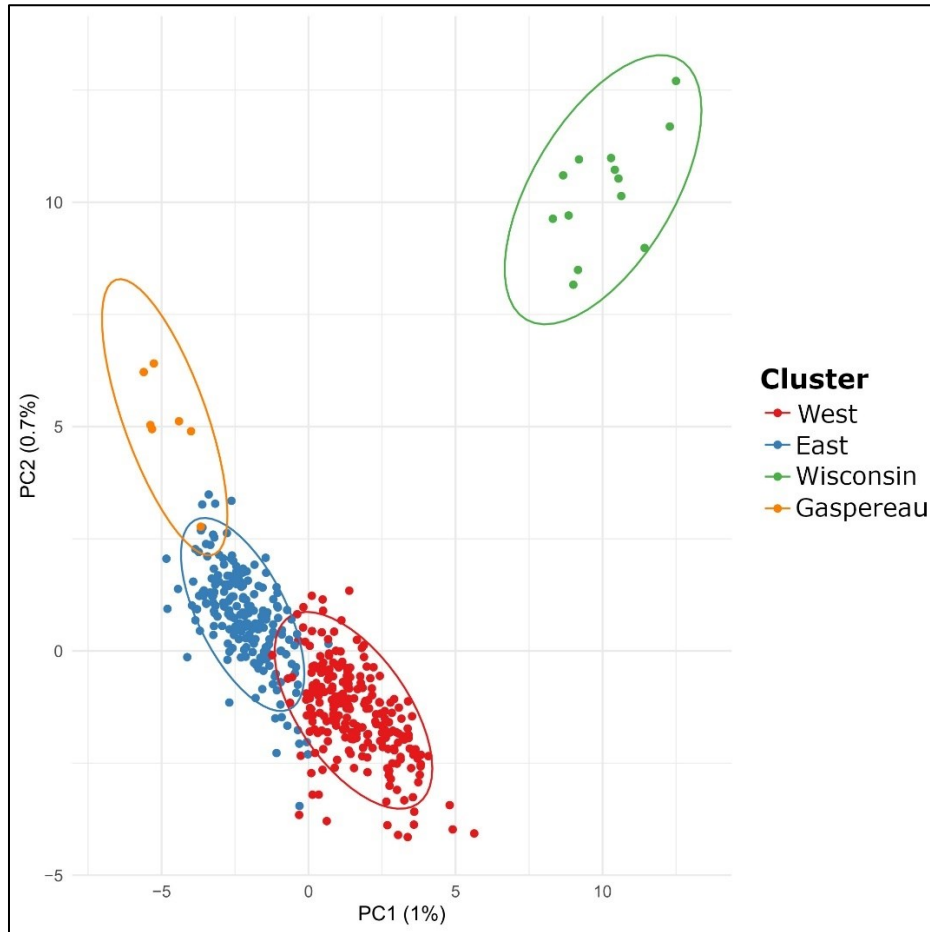


Figure 2.2 Principal Components Analysis of black ash samples. Individuals cluster in four groups: East, West, Wisconsin and Gaspereau

2.4.3 Population Differentiation and Inbreeding Statistics

For summary statistics, individuals were assigned to the main genetic cluster composing their genotype (East $n = 213$, West $n = 238$, Gaspereau $n = 7$, Wisconsin $n = 13$). Pairwise F_{ST} values (Table 2.1) indicate low genetic differentiation between the East and the West clusters ($F_{ST} = 0.0053$). In contrast, the Wisconsin and the Gaspereau clusters are the most genetically distinct ($F_{ST} = 0.1345$). The Pairwise F_{ST} values between the main genetic clusters and the two isolated clusters show intermediate levels of differentiation (F_{ST} values varying between 0.0474 and 0.0660).

Table 2.2 Pairwise F_{ST} values showing genetic differentiation between black ash clusters

Cluster	East	West	Gaspereau	Wisconsin
East	-	-	-	-
West	0.0053	-	-	-
Gaspereau	0.0621	0.0660	-	-
Wisconsin	0.0546	0.0474	0.1345	-

The inbreeding coefficients (F_{IS} ; Table 2.2) suggest that the East ($F_{IS} = -0.0034$) and the West ($F_{IS} = 0.0060$) clusters are close to Hardy-Weinberg equilibrium. In contrast, the Gaspereau ($F_{IS} = -0.1221$) and the Wisconsin ($F_{IS} = -0.1030$) clusters show an excess of heterozygous individuals.

Table 2.3 Inbreeding coefficient (F_{IS}) for each black ash genetic clusters

Cluster	F_{IS}
East	-0.0034
West	0.0060
Gaspereau	-0.1221
Wisconsin	-0.1030

2.5 Discussion

The objective of this research was to determine the genetic structure of black ash (*Fraxinus nigra*), an ecologically and culturally important endangered species, by sampling across most of its distribution range and analyzing the data with genotyping-by-sequencing (GBS). The importance of mountain ranges in shaping biodiversity and intraspecific genetic structure has been well documented (Perrigo *et al.*, 2020; Qu *et al.*, 2014) even in those of moderate elevation like the Carpathians (Ronikier, 2011) and the Pyrenees (Heuertz *et al.*, 2010). In Eastern North America, the role of the Appalachians in influencing the genetic structure of many plant and animal species has also been demonstrated (Jaramillo-Correa *et al.*, 2009; Soltis *et al.*, 2006). This impact has been found in temperate forest tree species, both coniferous (*Tsuga canadensis*; Potter *et al.*, 2012; *Pinus resinosa*; Walter and Epperson, 2005; *Pinus strobus*; Zinck and Rajora, 2016) and broadleaf (*Fraxinus pennsylvanica*; Huff *et al.*, 2022; *Fagus grandifolia*; Kitamura and Kawano, 2001; *Acer saccharum*; Vargas-Rodriguez *et al.*, 2015). Based on the phylogeography studies published so far, we hypothesised that black ash would be genetically structured into two groups separated by the Appalachians with a zone of introgression between them.

The results of our analyses partly support this hypothesis and revealed additional complexity. Using both model-based approaches with *a priori* evolutionary assumptions (ADMIXTURE) and assumption-free

ordination methods (PCA), combined with consideration of the species' biology and geographical history, we determined that four genetic clusters best represent our dataset (Figure 2.1). We identified two main groups, east and west of the Appalachians, and two isolated groups: one in Wisconsin and one in Gaspereau (Nova Scotia). The East and the West groups are strongly supported by our data due to the large number of populations sampled following the longitudinal gradient of the distribution range of the species. This pattern suggests the role of the Appalachians in the genetic discontinuity of the species, most likely during the Last Glacial Maximum (21,000 – 17,000 years before present) by splitting the species into distinct glacial refugia. This isolation for millennia had genetic consequences still visible in our data today. Following ice sheet retreat from the region around 16,000 – 14,000 years before present (Delcourt and Delcourt, 1987), the groups began migrating and actively exchanging pollen again. This ongoing gene flow is supported by the pairwise F_{ST} value between the two groups (0.0053). Tree pollen is known to travel great distances, being lifted up to 3 km into the air and transported over 1,000 km by winds of 30 km/h (Robichaud and Comtois, 2021). Ash fruits can also be dispersed over long distances, floating on water (Thébaud and Debussche, 1991) or being blown by winds on snow (Curtis, 1959). This genetic exchange between the East and the West genetic cluster is well represented in our ADMIXTURE results, as populations closer to the Appalachians show more introgression from the other group than those at both latitudinal extremes (Figures 2.1 and S6). While this glacial refugia hypothesis fits the biogeographic history of the region, other factors such as isolation by distance or ecological gradients could also contribute to the observed east-west genetic structure. Notably, Eastern North America exhibits a pronounced east-west precipitation gradient, with higher precipitation in the east decreasing westward (PRISM, 2025). This environmental gradient corresponds closely with the observed structure pattern, suggesting that climatic factors may also drive population differentiation in this species.

The Wisconsin and the Gaspereau groups are more isolated from the East and the West groups and from one another (Table 2.1). In contrast to the two main groups, the Wisconsin (F_{IS} : -0.1030) and the Gaspereau (F_{IS} : -0.1221) groups present an excess of heterozygous individuals. A hypothesis for this excess could be hybridization with another species. Though black ash is not known to hybridize with other North American species (COSEWIC, 2019), it can hybridize with its closest phylogenetic relative: Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica*) native to Asia. In fact, two cultivars were produced by hybridizing these species and are known as 'Northen Tresure' and 'Northen Gem' (Davidson, 1999; Koch *et al.*, 2012). It could also result from hybridization with European ash (*Fraxinus excelsior*), which, like black ash and Manchurian ash, belong to the *Fraxinus* section and is commonly found in Nova Scotia (COSEWIC, 2019). Further analysis of

the genome of these two isolated clusters would be enlightening to find out if they have private alleles coming from a different species.

Our dataset includes two populations in Wisconsin: one in White River Fishery Area, composed of 13 samples all clustering to the Wisconsin cluster and one in Muddy Creek Wildlife Area, composed of 17 samples all clustering to the West cluster. A hypothesis for the isolated genetic cluster found in White River Fishery Area could be that it was isolated in a distinct glacial refugium during the Last Glacial Maximum. A region covering part of the Wisconsin, called the Driftless Area, was circumvented by the ice sheet during the last glaciation (Knoot *et al.*, 2015) hosting a wide range of deciduous forest animal and plant species (Li *et al.*, 2013). More populations would need to be sampled in the region to determine whether this genetic cluster occurs elsewhere. So far, the Driftless Area hypothesis does not seem to be the best fit for our data as the Muddy Creek Wildlife Area population is the one closest to the Driftless Area.

The isolated genetic cluster found in Gaspereau is quite surprising. This population is composed of 10 individuals: seven cluster with the unique group and three with the East cluster. Nova Scotia is one of the best-sampled areas in our dataset with 12 populations and 103 individuals. We contacted our collaborators in Nova Scotia to obtain more information on the sampled trees. They confirmed that these samples were collected in a natural forest and informed us that the Mi'kmaq, who also use black ash for basketmaking, had a historic settlement along the Gaspereau River prior to European colonization of the region. The trees sampled, or their ancestor, could be the result of seeds acquired from trade partners in Eastern North America and planted there. This hypothesis could explain the excess of heterozygosity found at this site, but not why they form a unique genetic cluster. If they originated from a different region, we should see a proportion of their genetic composition clustering with their population of origin. However, there is the possibility that this population of origin was not sampled.

The assembly of the black ash reference genome is underway, and its availability will allow for more refined analyses of the species' genetic structure. This will enable improved read mapping, variant calling accuracy, and identification of structural variants that may be missed with current reference-free approaches. It is also important to complete the sampling of the entire distribution range by including populations at its southern limit in states from Iowa to Connecticut, which may harbour unique genetic variation or represent distinct evolutionary lineages. These southern populations are particularly valuable

given climate change projections, as they may contain alleles conferring tolerance to warmer and drier conditions that could be critical for the species' future persistence. Additionally, more populations should be sampled in Wisconsin and around Gaspereau to confirm their uniqueness with additional genetic data. Increased sampling density would also allow for landscape genetic analyses to identify environmental factors driving population differentiation.

To further investigate the genetic diversity of the species, the next step would be to determine the local adaptation of populations to climate. Given our understanding of the genetic structure of the species, it is now possible to identify associations between SNP and climate variables that drive population adaptation through genotype-environment associations (GEA). Subsequently, projections of future climate can be used to calculate the level of adaptation needed for current allele frequencies within populations to adapt to future local climates (genomic offset; GO), thus identifying the populations that are most at risk under future climate projections and allowing conservation efforts to be prioritized accordingly (Melton *et al.*, 2025).

The genetic groups identified in this study provide the essential framework for conservation efforts needed to address the multiple threats faced by black ash, including widespread mortality from emerald ash borer, habitat loss driven by climate change, and emerging threats such as ash dieback. Preserving the biodiversity and ecological functions of black ash wetlands and riparian ecosystems also ensures the cultural continuity of the First Nations for whom the species holds profound cultural significance. Ultimately, the results of this research enable the development of conservation plans specific to each genetic group to ensure the long-term preservation of the genetic heritage of black ash for future generations.

2.6 Acknowledgements

We are grateful to Manuel Lamothe and Lisa Tischenko for their guidance with the data analyses. We thank the following people for the samples provided: Allan Fretz, Donnie McPhee, Eric Dussault, Isabelle Aubin, Jean-François Légaré, Lynn Jacobs, Martin Williams, Melissa Spearing, Nicholas J. Leach, Philippe Labrie, Samuel Royer-Tardif and Sébastien Dagnault. This work was supported by three funding sources: the Genomics Research and Development Initiative (GRDI) to Nathalie Isabel, a NSERC Alliance grant to Yann Surget-Groba (ALLRP 588289), and a Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) graduate scholarship to Pier-Alexandre Grenier (<https://doi.org/10.69777/347534>).

2.7 Author Contributions

Pier-Alexandre Grenier conducted laboratory work, analyzed the data, interpreted the results, and wrote the manuscript. Lyne Touchette helped with project management throughout the study, designed the black ash leaf collection protocol, and conducted laboratory work. Kyra LoPiccolo designed the extraction protocol for black ash leaf tissue, conducted laboratory work, and performed the bioinformatics for the *de novo* assembly, variant calling, and quality control filtering of the raw sequences. Jill Hamilton contributed to the conception of the project, provided the samples from the United States, and supervised the research. Nathalie Isabel and Yann Surget-Groba conceived and designed the project, obtained funding, provided guidance throughout the research process, contributed to the interpretation of the results, and reviewed the manuscript.

CHAPITRE 3

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le frêne noir (*Fraxinus nigra*) est une espèce en danger critique d'extinction qui nécessite des mesures immédiates afin d'assurer la préservation de son potentiel évolutif. Depuis l'arrivée de l'agrile du frêne (*Agrilus planipennis*) en Amérique du Nord, les populations situées à l'épicentre de l'infestation ont été décimées. Ce n'est qu'une question de temps avant que l'insecte envahisse l'ensemble de l'aire de distribution de cette espèce, à la fois sacrée pour certaines Premières Nations et essentielle aux écosystèmes humides et ripariens.

L'échantillonnage de la majorité du territoire occupé par le frêne noir et l'analyse de l'ADN de chaque individu ont permis de révéler l'existence de quatre groupes génétiques distincts au sein de l'espèce. Un groupe situé dans l'est et un groupe situé dans l'ouest séparés par les Appalaches. Ainsi que deux groupes génétiques isolés : un au Wisconsin et un autre à Gaspereau en Nouvelle-Écosse.

La première limite de notre étude est l'utilisation d'un assemblage de novo pour nos analyses, puisque le génome de référence du frêne noir n'était pas encore disponible. Bien qu'un tel génome ne soit pas nécessaire pour les analyses de structure génétique, un assemblage de novo peut regrouper des paralogues et ainsi surestimer l'hétérozygotie. Il est à noter que les échantillons ont été placés aléatoirement dans les plaques de séquençage. Cette surestimation affecte donc tous les individus et n'est pas responsable de l'excès spécifique aux groupes du Wisconsin et de Gaspereau. Les filtres rigoureux appliqués lors du traitement bioinformatique ont permis de limiter la surestimation causée par cette méthode, mais une grande partie des données de séquence a été perdue. Une fois l'assemblage du génome de référence disponible, nos analyses pourront être relancées afin d'affiner les résultats de la structure génétique de l'espèce.

Deuxièmement, notre étude ne comprend pas de populations situées à la limite sud de l'aire de répartition de l'espèce. Cette zone est importante à considérer dans l'étude de la structure génétique du frêne noir, car ces populations se trouvent probablement à proximité des refuges glaciaires et pourraient contenir des variations génétiques importantes pour le potentiel évolutif de l'espèce. Ces populations pourraient aussi porter des adaptations aux climats plus chauds et plus secs de ces latitudes (Melton *et al.*, 2025).

Elles présentent donc un grand intérêt pour l'adaptation aux changements climatiques, tout en étant les plus à risque d'extirpation.

Troisièmement, pour confirmer l'unicité des deux groupes génétiques isolés, il sera nécessaire d'échantillonner davantage de populations au Wisconsin et dans les localités avoisinantes de Gaspereau (Nouvelle-Écosse). Des analyses morphologiques plus approfondies des individus récoltés dans ces localités permettront d'avoir une meilleure idée de leur identification à l'espèce. Par la suite, les échantillons prélevés permettront de comparer leur génome avec ceux du frêne noir, du frêne commun et du frêne de Mandchourie pour valider leur identification. Comme l'agrile du frêne est déjà présent dans ces régions, ces populations représentent une priorité pour la conservation ex situ. Étant de petite taille, elles pourraient facilement disparaître.

En s'appuyant sur la structure génétique révélée par cette recherche, la prochaine étape du projet visant à documenter la diversité génétique du frêne noir consistera à étudier l'adaptation locale des populations au climat. Cela permettra de déterminer les variables climatiques importantes pour leur adaptation et les marqueurs génétiques auxquels ils sont reliés. Puis, à l'aide de projections climatiques, il sera possible d'identifier les populations les plus vulnérables aux changements climatiques pour orienter les efforts de conservation de manière ciblée.

Il est désormais possible de mettre en place un plan de conservation spécifique pour chacun des quatre groupes génétiques. Ceux-ci devront inclure la récolte de graine pour la conservation ex situ qui est urgente dans le contexte de la forte mortalité actuelle. Il s'agit de préserver la plus grande part de la diversité génétique possible, essentielle à l'adaptation de l'espèce face aux changements climatiques. Certaines populations sont menacées de disparition à court terme en raison des ravages causés par l'agrile du frêne, ou à moyen terme à cause des changements climatiques. Il est de notre devoir de conserver le patrimoine génétique de l'espèce pour les générations futures.

ANNEXE A

SUPPLEMENTARY FIGURES

Article title: Echoes of the Appalachians: Genetic Structure of a Threatened Tree Species Across Eastern North America

Authors: Pier-Alexandre Grenier, L. Touchette, K. LoPiccolo, J. Hamilton, N. Isabel, Y. Surget-Groba

The following supporting figures are available for this article:

Figure A.1 Detection of batch effect in genomic data: PCA reveals clustering by sequencing plate

Figure A.2 Batch effect correction: PCA after SNP filtering eliminates plate-associated clustering

Figure A.3 Cross-validation error rates for ADMIXTURE analysis (K = 1 to 10)

Figure A.4 ADMIXTURE bar plots for K = 1 to 10 showing ancestry proportions of black ash individuals ordered from west to east

Figure A.5 ADMIXTURE bar plots for K = 4 showing ancestry proportions of black ash individuals ordered from west to east

Figure A.6 Distribution of black ash genetic clusters (without overlapping population diagrams). Four clusters were identified: East, West, Wisconsin, and Gaspereau (Nova Scotia). Each pie chart represents the average proportion of each genetic cluster within a population

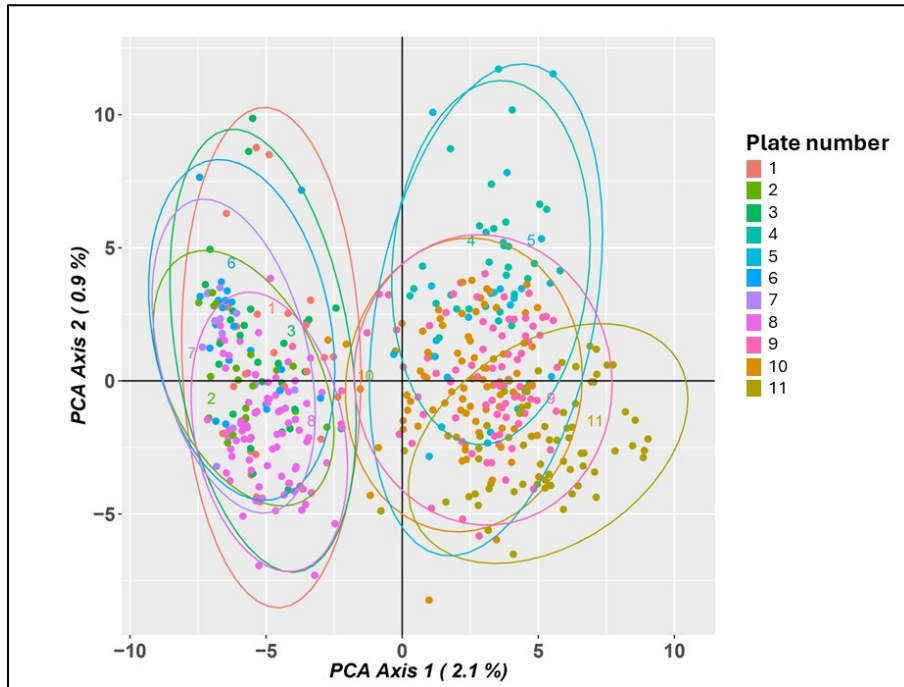


Figure A.1 Detection of batch effect in genomic data: PCA reveals clustering by sequencing plate

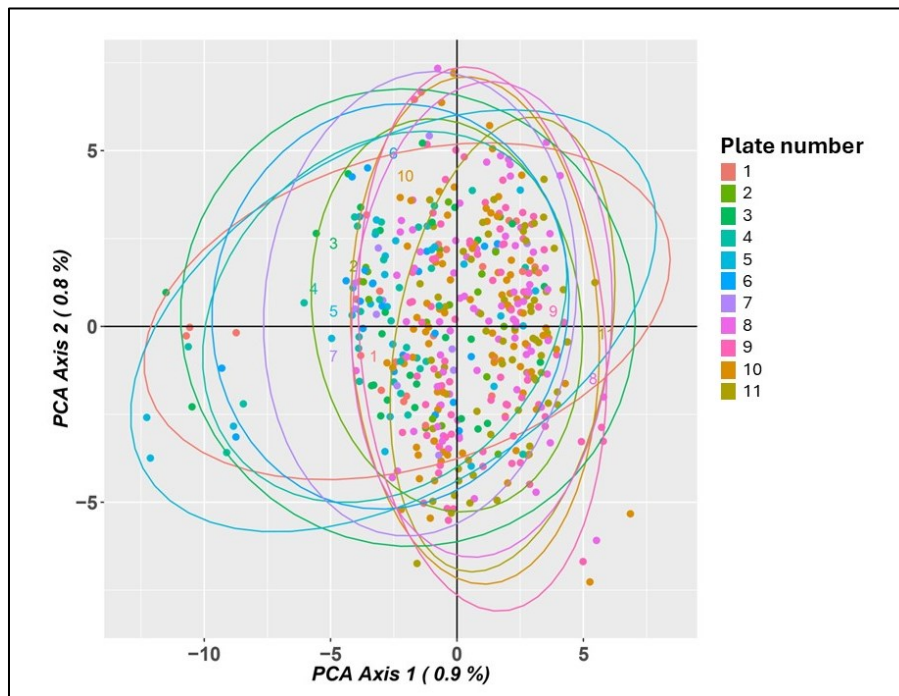


Figure A.2 Batch effect correction: PCA after SNP filtering eliminates plate-associated clustering

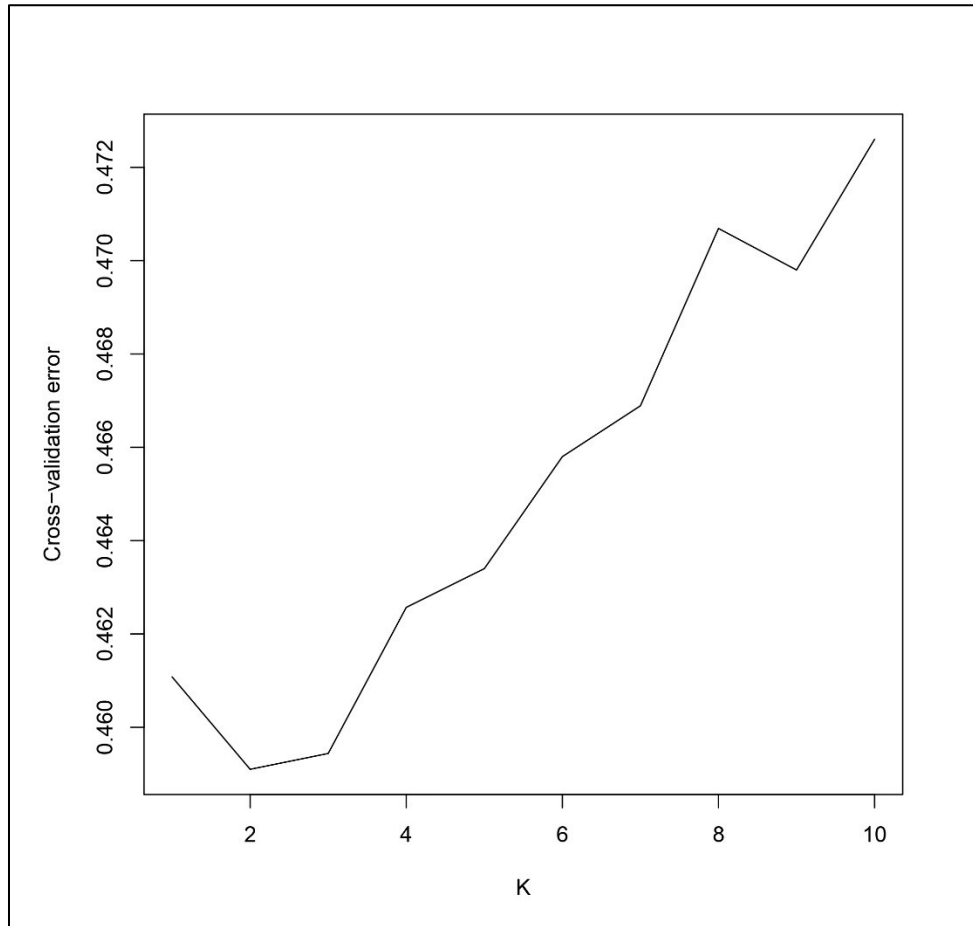


Figure A.3 Cross-validation error rates for ADMIXTURE analysis (K = 1 to 10)

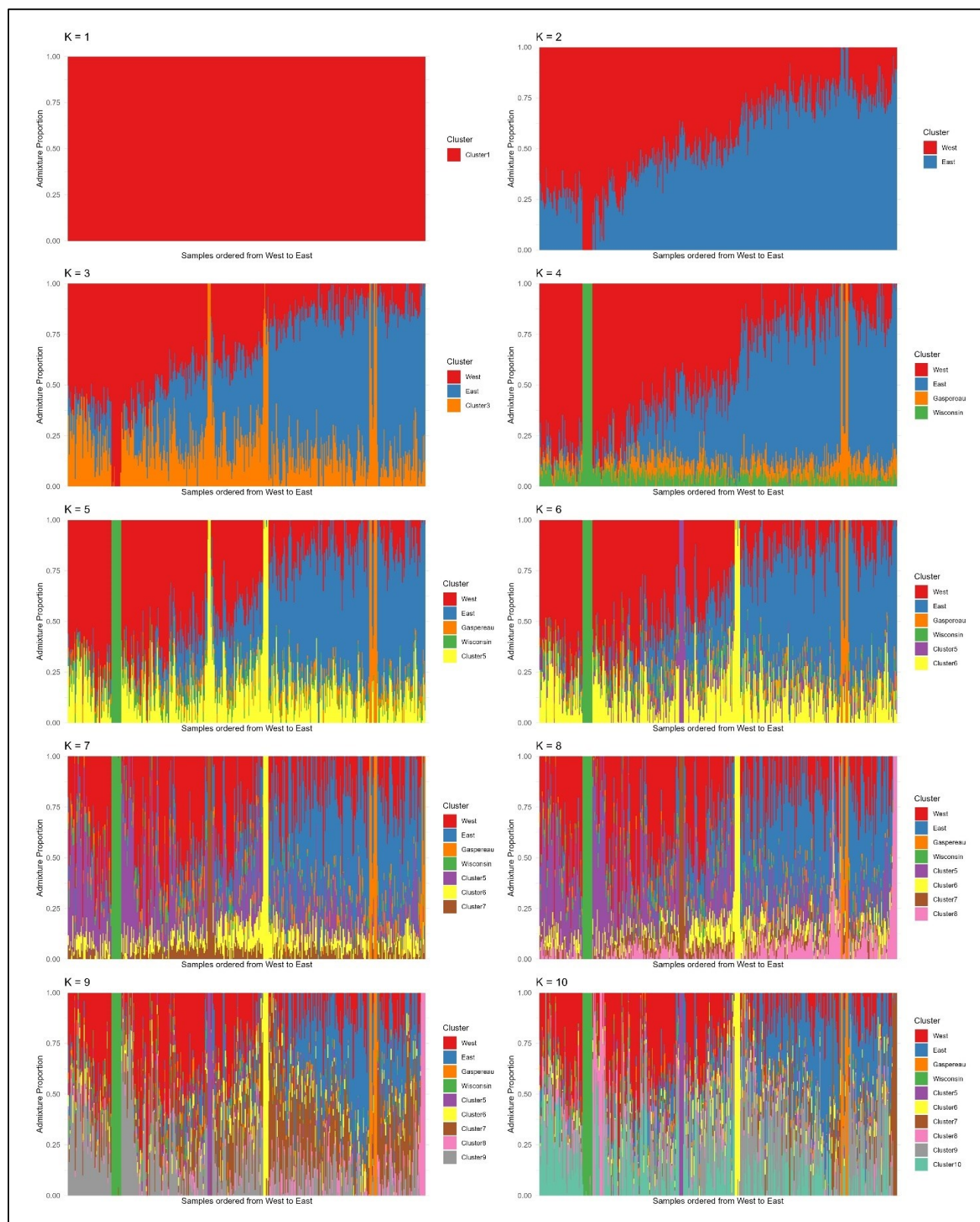


Figure A.4 ADMIXTURE bar plots for K = 1 to 10 showing ancestry proportions of black ash individuals ordered from west to east

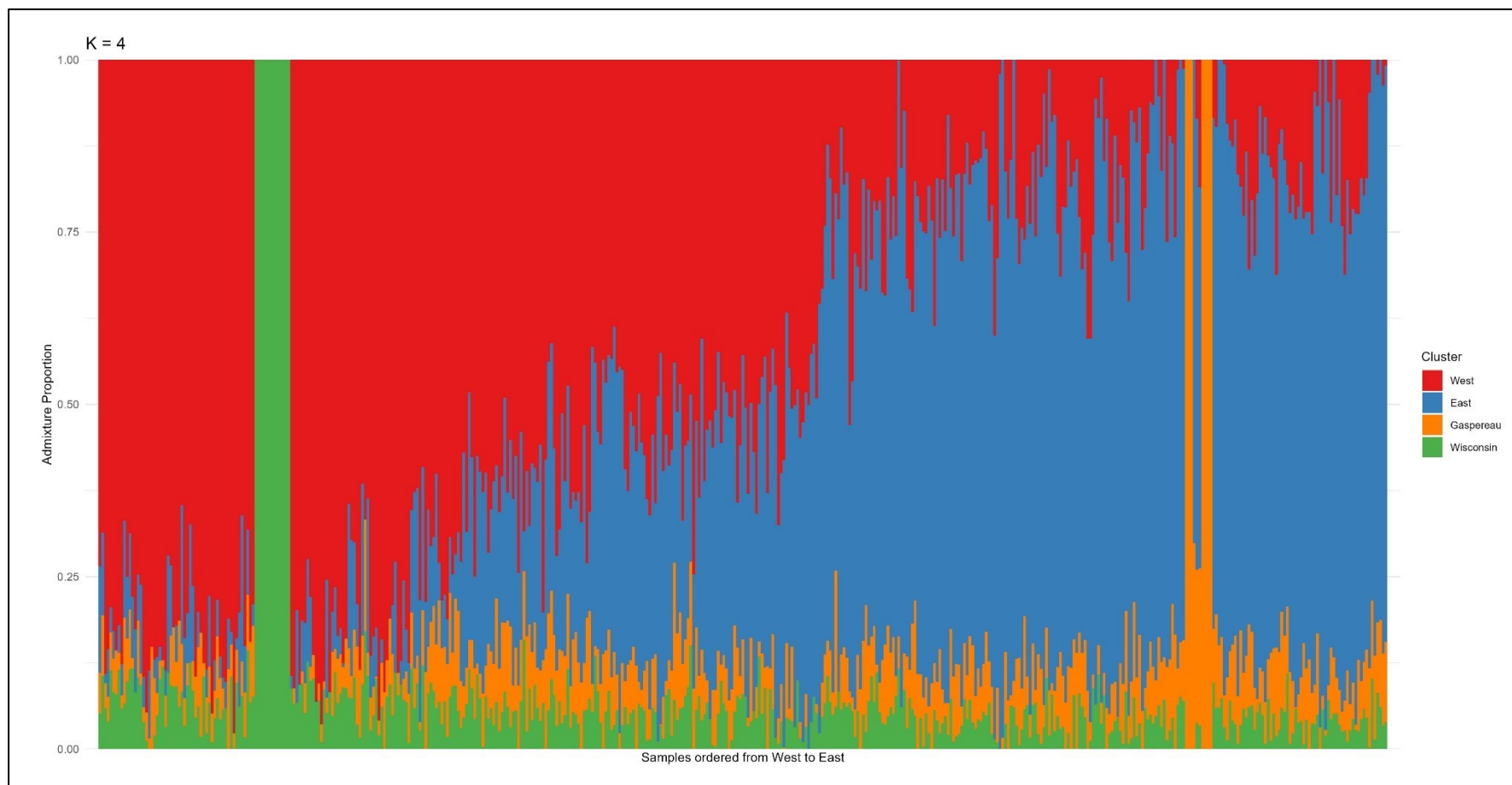


Figure A.5 ADMIXTURE bar plots for K = 4 showing ancestry proportions of black ash individuals ordered from west to east

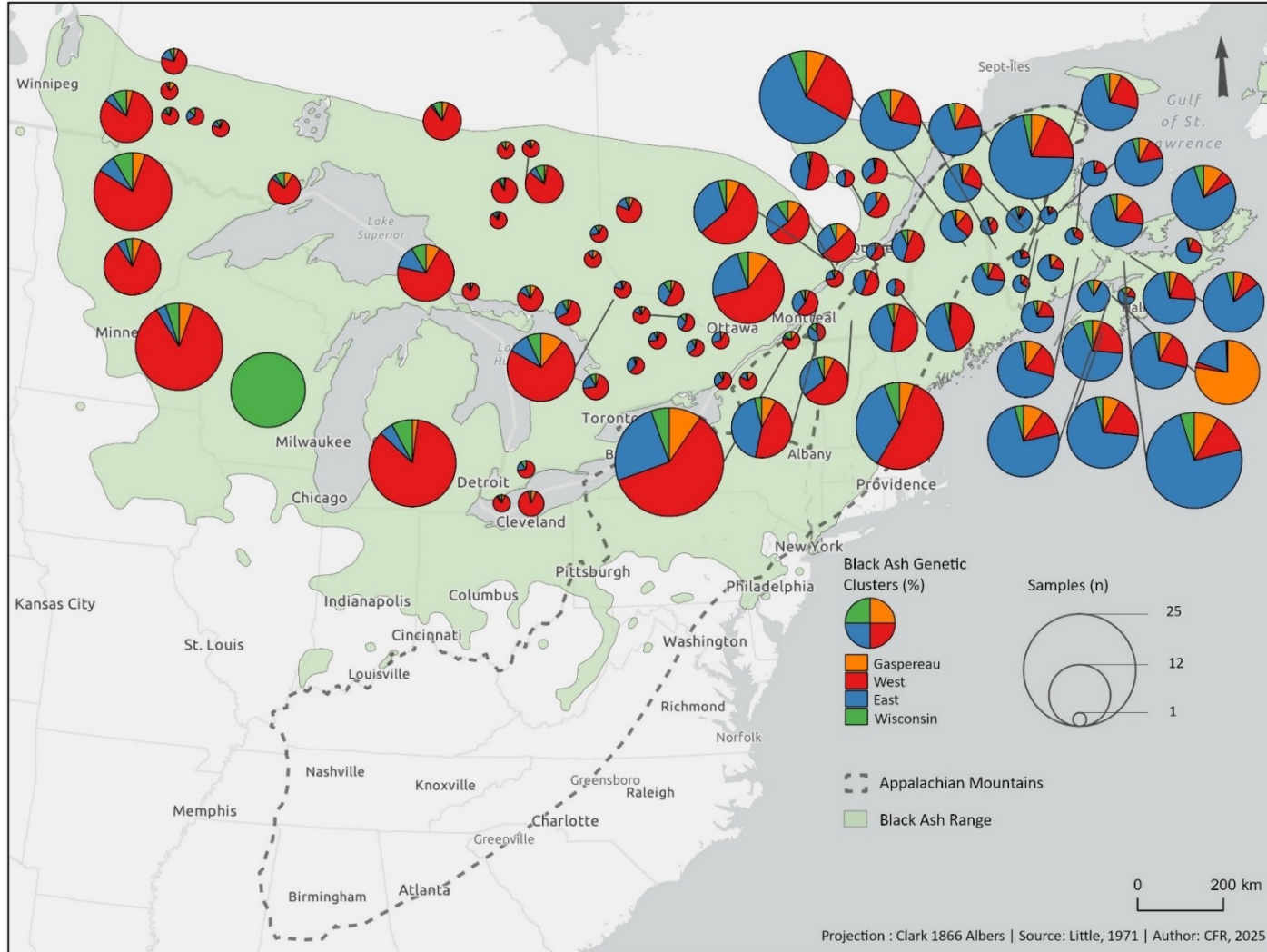


Figure A.6 Distribution of black ash genetic clusters (without overlapping population diagrams). Four clusters were identified: East, West, Wisconsin, and Gaspereau (Nova Scotia). Each pie chart represents the average proportion of each genetic cluster within a population

ANNEXE B

BLACK ASH LEAF COLLECTION PROTOCOL

Article title: Echoes of the Appalachians: Genetic Structure of a Threatened Tree Species Across Eastern North America

Authors: Pier-Alexandre Grenier, L. Touchette, K. LoPiccolo, J. Hamilton, N. Isabel, Y. Surget-Groba

Methods B.1 Black Ash Leaf Collection Protocol

Objective: Evaluate the genetic variation of *Fraxinus nigra* across its natural range.

What: Fresh *F. nigra* leaves

How much:

- **2 leaflets**/individual
- **15-20** individuals/population

Where:

- Populations identified beforehand.
- A very dense sampling at a local scale is not necessary. 15-20 individuals would be ideal.

Material:

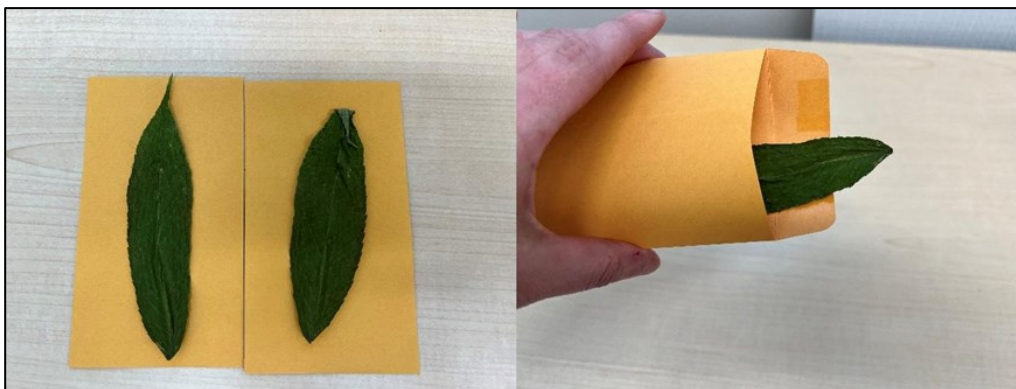
- Envelopes
- Silica gel packets (10 g)
- Silica beads (orange)
- Large size Ziploc bags



How:

First select 15-20 individuals at least 7-10 m apart if possible. Trees can be of different age/size. If possible, select dominant mature trees or sprouts from these trees.

1. For each sampled individual, collect **2 healthy leaflets** and place them in envelopes (1 leaflet/envelope). **Do not put more than 1 leaflet per envelope.**

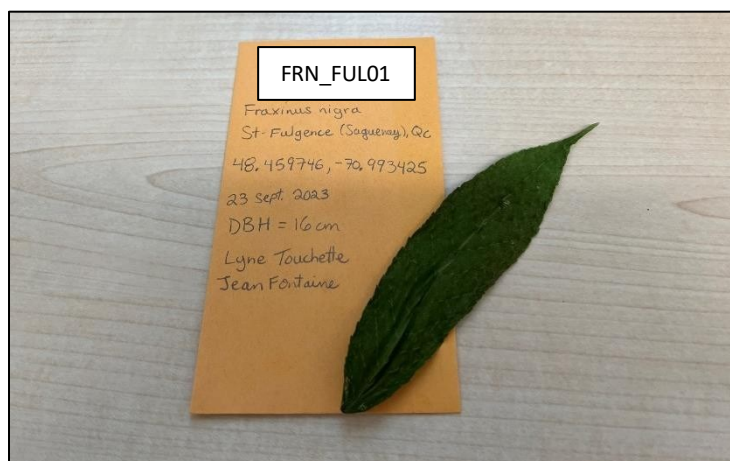


2. Identify each sample on the envelope (ID) with the following elements (see example):

- Species code: FRN
- Site: use 3 letters to identify the site based on the locality
- Tree number: 01 to 15 or 20 Example: FRN_FUL01

Example: **FRN_FUL01**

3. Record the coordinates (latitude, longitude), the name of the location, the date of collection, and the name of the collector. If possible, measure the DBH of the tree and add any comment that you think may be relevant (ex.: habitat).



4. Close the envelopes (but **DO NOT seal them**) and place them directly in a Ziploc bag with **10 silica gel packets** (10g) (provided). **Disperse the silica gel packets between the envelopes**. Try to avoid having envelopes stuck in the middle of the bag with no silica packets between them. Separate the envelopes from the same population in two large size Ziploc bags. **Add silica beads in each large Ziploc bag** to ensure maximal drying conditions. Add enough silica beads to hide the bottom of the bag (see picture below).

DO NOT seal the envelope



****Important****

Proper drying of the leaves is a crucial step in obtaining good quality DNA. Once harvested, do not let the leaves air-dry. Put rapidly the envelopes in a Ziploc bag with silica gel packets.

Handling and conservation:

The silica gel packets and silica beads will effectively dry the leaves. Therefore, there should be no problem with storage, as the leaves will be dehydrated with the silica. Keep the leaves at room temperature in a dry place.

ANNEXE C

EXTRACTION PROTOCOL FOR BLACK ASH (*FRAXINUS NIGRA*) LEAF TISSUE

Article title: Echoes of the Appalachians: Genetic Structure of a Threatened Tree Species Across Eastern North America

Authors: Pier-Alexandre Grenier, L. Touchette, K. LoPiccolo, J. Hamilton, N. Isabel, Y. Surget-Groba

Methods C.2 Extraction Protocol for Black Ash (*Fraxinus nigra*) Leaf Tissue

*Note: This protocol utilizes the NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Allentown, PA, USA) and has been adapted from the manufacturer's instructions to optimize DNA yield specifically for black ash (*Fraxinus nigra*).*

TISSUE GRINDING

1) Prepare 2.0 mL tubes

- Label each tube with the sample's name/working number
- Add 4 metal grinding beads (3.2 mm diameter) to each vial

2) Weight 30 mg (0.03 g) of **DRY** leaf tissue and transfer into prepped 2.0 mL tube

- If using fresh tissue, use ~100 mg (0.1 g)
 - Keep frozen/cold using liquid nitrogen

3) Remove shaker blocks from the -80°C freezer and pour liquid nitrogen over them to keep them cool

4) Add 2.0 mL tubes to the shaker blocks, **making sure to keep them balanced (i.e. same number and position of tubes in each block)**

5) Pour liquid nitrogen over the tube-filled shaker blocks to freeze the leaf tissue and keep the blocks cold

6) Place the shaker blocks into the shaker and secure

- Shake at 30 1/s for 25 seconds

7) Remove the tubes from the shaker blocks and place in the -80°C freezer for future use

PREPARATORY STEPS

1) Thaw RNase A at room temperature (stored in -20°C freezer)

2) Preheat elution buffer and lysis buffer (PL1) in 65°C water bath

- Elution buffer can be warmed before the elution step (is a small bottle and will warm up quickly)

DNA EXTRACTION

1) Prepare master mix of cell lysis buffer (PL1) and RNase A (do this in a 15 mL conical tube)

- Add 250 µL of PL1 and 22.5 µL of RNase A per sample
 - When making the master mix, make enough for n+1 (n = number of samples)

2) Add 250 µL of master mix and 250 µL of PL2 into each 2.0 mL tube

- Vortex briefly

3) Incubate the samples in 65°C water bath for 75 minutes

- Every 15 minutes, vortex the samples; then place back into the water bath
- Get ice for the next step

4) Add 175 µL of PL3 buffer (precipitation buffer) to all samples

- Vortex to homogenize
- Incubate on ice for 20 minutes

5) While incubating, prepare the following:

- Place purple and green columns on corresponding collection vials (they come in the kit together)
 - Label the tops of the columns with the sample's working number
- Obtain two sets of 1.5 mL tubes
 - Label one set with the sample's working number
 - Label the other set with the detailed sample information (for final DNA elution)
 - Label tops AND sides of the tube with TWO coats of fine-tip Sharpie

6) Add 700 µL of PC solution (binding buffer) to the first set of 1.5 mL tubes (with the working number)

7) Once the incubation on ice is complete, centrifuge the crude lysate at 20,000 x g (max speed) for 3 minutes

- Centrifuge with the tabs of the 2.0 mL tubes pointed outward so that the pellet will be easy to locate following centrifugation

8) Load ~500 µL of lysate/supernatant (AVOID PELLET) into the purple column

9) Centrifuge for 1 minute and 30 seconds at 12,000 rpm

- During this time, ensure 1.5 mL tubes with 700 µL of PC binding buffer are prepared

10) Keep the flowthrough (i.e. contents in the collection tube) and discard the filter

11) Transfer this resulting flowthrough into the 1.5 mL tubes pre-filled with PC binding buffer

- Set your pipette for 600 µL; be aware that the volume of supernatant may vary between samples
- Add supernatant to the PC buffer and mix well via pipette
 - The ratio of PC:Supernatant is ~1:1. The PC binding buffer can be in slight excess to the supernatant

12) Bind DNA to the column

- Load 600 µL of the sample (i.e. PC:Supernatant combo) onto the **green** columns
- Centrifuge for 1 minute and 30 seconds at 12,000 rpm
- Discard the flowthrough via pipette
- Transfer remainder of the sample onto the **green** column and spin; discard flowthrough via pipette (repeat this step as many times as needed, ~3x)

13) Wash and dry silica columns

- **1st Wash:** this wash works to minimize transfer of the easy-to-crystallize GuHCl on gloves, caps, outside of tubes, etc. Traces of this chemical can have a severe effect on Nanodrop readings of extracted DNA
 - Add 300 µL of PC binding buffer to the **green** column and incubate for 10 minutes at ~60°C (in the thermostat)
 - Centrifuge for 1 minute and 30 seconds at 12,000 rpm
 - Discard the flowthrough via pipette
- **2nd Wash:** also works to minimize transfer of GuHCl
 - Add 400 µL of PW1 buffer to the **green** column and incubate for 10 minutes at ~60°C (in the thermostat)
 - Centrifuge for 1 minute and 30 seconds at 12,000 rpm
 - Discard the flowthrough via pipette
 - OPTIONAL: if the flowthrough still has color, repeat this wash step with 200 µL PW1 (but this can reduce final yield)
- **3rd Wash**
 - Add 700 µL PW2 buffer to the **green** column
 - Run your pipette tip around the inner rim of the **green** column to wash it down
 - Centrifuge for 1 minute and 30 seconds at 12,000 rpm
 - Discard the flow through via pipette
 - **REPEAT** 3rd wash one more time

14) Dry the column (no buffer) via centrifuge for 2 minutes and 30 seconds at 12,000 rpm

15) Elute the DNA

- Place the **green** column (filter piece) into a new 1.5 mL tube that is labeled with the corresponding sample information
- Pipette 35 μ L of PE Elution Buffer onto the center of each **green** filter membrane
 - If not done previously, preheat the elution buffer 65°C before adding to the column
- Incubate with the lids CLOSED for 10 minutes at ~65°C (in the thermostat)
- Centrifuge for 2 minutes and 30 seconds at 10,000 rpm
 - Ensure lids are facing to the right so they do not snap off during centrifugation
- Place tubes on ice for quantification or directly into the -80°C freezer

ANNEXE D

METADATA FOR ALL SAMPLES INCLUDED IN THE STUDY, ORDERED FROM WEST TO EAST

Article title: Echoes of the Appalachians: Genetic Structure of a Threatened Tree Species Across Eastern North America

Authors: Pier-Alexandre Grenier, L. Touchette, K. LoPiccolo, J. Hamilton, N. Isabel, Y. Surget-Groba

Dataset D.1 Metadata for all samples included in the study, ordered from west to east

ID	Sample	Province	Latitude	Longitude	Locality	West	East	Wisconsin	Gaspereau	Cluster
1	FRANIGMNFOR_7	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.735335	0.154003	0.051443	0.059218	West
2	FRANIGMNFOR_6	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.686268	0.119804	0.106379	0.087549	West
3	FRANIGMNFOR_5	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.890781	0.014039	0.059146	0.036034	West
4	FRANIGMNFOR_3	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.855542	0.068581	0.039731	0.036146	West
5	FRANIGMNFOR_20	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.79423	0.036237	0.113567	0.055966	West
6	FRANIGMNFOR_2	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.828926	0.040124	0.082934	0.048016	West
7	FRANIGMNFOR_19	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.856651	0.00001	0.079108	0.064231	West
8	FRANIGMNFOR_17	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.819937	0.040808	0.114818	0.024437	West
9	FRANIGMNFOR_16	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.876588	0.045181	0.058067	0.020164	West
10	FRANIGMNFOR_15	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.668765	0.140461	0.065893	0.124881	West
11	FRANIGMNFOR_12	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.750518	0.089026	0.098032	0.062424	West
12	FRANIGMNFOR_11	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.686643	0.110964	0.115887	0.086506	West
13	FRANIGMNFOR_10	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.779409	0.088421	0.117341	0.014829	West
14	FRANIGMNFOR_1	MN	47.8604	-93.9721	Big Fork State Forest	0.826386	0.091503	0.082102	0.00001	West
15	FRANIGMNLW_5	MN	46.358	-93.6973	Wealthwood State Forest	0.746429	0.067142	0.104491	0.081938	West

16	FRANIGMNWLW_4	MN	46.358	-93.6973	Wealthwood State Forest	0.761913	0.128351	0.093019	0.016717	West
17	FRANIGMNWLW_20	MN	46.358	-93.6973	Wealthwood State Forest	0.894869	0.04469	0.039402	0.021039	West
18	FRANIGMNWLW_2	MN	46.358	-93.6973	Wealthwood State Forest	0.947108	0.00001	0.012563	0.040319	West
19	FRANIGMNWLW_18	MN	46.358	-93.6973	Wealthwood State Forest	0.885868	0.098729	0.00001	0.015393	West
20	FRANIGMNWLW_14	MN	46.358	-93.6973	Wealthwood State Forest	0.85126	0.00001	0.00001	0.14872	West
21	FRANIGMNWLW_12	MN	46.358	-93.6973	Wealthwood State Forest	0.870654	0.026436	0.019643	0.083268	West
22	FRANIGMNWLW_1	MN	46.358	-93.6973	Wealthwood State Forest	0.866568	0.052313	0.048955	0.032165	West
23	FRANIGON_202330129	ON	49.5554	-93.4743	Dryden	0.851598	0.020322	0.102286	0.025793	West
24	FRANIGON_202330128	ON	49.59732	-93.29657	Dryden	0.870812	0.00001	0.119899	0.009279	West
25	FRANIGON_202330130	ON	49.58591	-93.18855	Dryden	0.885919	0.036492	0.032339	0.045251	West
26	FRANIGON_202330131	ON	49.50757	-93.15211	Dryden	0.719081	0.170117	0.110792	0.00001	West
27	FRANIGON_202330193	ON	49.793106	-92.842752	Dryden	0.733958	0.101398	0.091902	0.072741	West
28	FRANIGON_202330134	ON	49.76986	-92.83054	Dryden	0.823716	0.00001	0.090508	0.085766	West
29	FRANIGON_202330132	ON	49.60315	-92.36751	Dryden	0.820727	0.052931	0.090735	0.035608	West
30	FRANIGON_202330194	ON	50.15848	-93.25818	Camp Robinson	0.813469	0.00001	0.061315	0.125205	West
31	FRANIGON_202330203	ON	50.3781	-93.14578	Perrault Falls	0.646407	0.201446	0.083278	0.068869	West
32	FRANIGON_202330204	ON	50.34504	-93.13852	Perrault Falls	0.839266	0.0872	0.033658	0.039876	West
33	FRANIGON_202330135	ON	49.68756	-92.40572	Dinorwic	0.802819	0.072668	0.091731	0.032781	West
34	FRANIGON_202330136	ON	49.68131	-92.3375	Dymont	0.673943	0.200836	0.12521	0.00001	West
35	FRANIGON_202330137	ON	49.4639	-91.89908	Butler	0.76331	0.108598	0.084127	0.043965	West
36	FRANIGWIMUD_9	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.895149	0.00001	0.044961	0.05988	West
37	FRANIGWIMUD_8	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.800773	0.051555	0.061732	0.08594	West
38	FRANIGWIMUD_7	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.831361	0.00001	0.017715	0.150913	West
39	FRANIGWIMUD_5	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.875314	0.00001	0.104887	0.019789	West
40	FRANIGWIMUD_4	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.884478	0.040788	0.022842	0.051891	West

41	FRANIGWIMUD_3	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.777613	0.10273	0.067632	0.052025	West
42	FRANIGWIMUD_2	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.948419	0.00001	0.009608	0.041963	West
43	FRANIGWIMUD_19	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.871291	0.044485	0.044201	0.040022	West
44	FRANIGWIMUD_18	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.783474	0.05328	0.073341	0.089905	West
45	FRANIGWIMUD_17	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.86575	0.031896	0.042838	0.059516	West
46	FRANIGWIMUD_16	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.895693	0.016684	0.057251	0.030372	West
47	FRANIGWIMUD_15	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.902927	0.037888	0.059175	0.00001	West
48	FRANIGWIMUD_13	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.810468	0.073807	0.00001	0.115716	West
49	FRANIGWIMUD_12	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.829977	0.018587	0.104679	0.046757	West
50	FRANIGWIMUD_11	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.977213	0.00001	0.001549	0.021227	West
51	FRANIGWIMUD_10	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.839375	0.016541	0.095613	0.048471	West
52	FRANIGWIMUD_1	WI	44.882793	-91.749468	Muddy Creek Wildlife Area	0.802041	0.136864	0.061002	0.000093	West
53	FRANIGON_944892	ON	48.05199	-89.56247	Lake Lenore	0.660988	0.211916	0.076724	0.050372	West
54	FRANIGQC_942512	QC	48.04711	-67.67229	Lake Lenore	0.850933	0.067091	0.016771	0.065205	West
55	FRANIGON_941873	ON	48.35329	-89.35401	Thunder Bay	0.682098	0.09434	0.143104	0.080459	West
56	FRANIGON_941870	ON	48.34633	-89.31744	Thunder Bay	0.844543	0.00001	0.067778	0.087668	West
57	FRANIGON_941875	ON	48.34638	-89.31742	Thunder Bay	0.790299	0.031088	0.075603	0.10301	West
58	FRANIGWIWTR_9	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
59	FRANIGWIWTR_7	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
60	FRANIGWIWTR_6	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
61	FRANIGWIWTR_20	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
62	FRANIGWIWTR_19	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin

63	FRANIGWIWTR_18	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
64	FRANIGWIWTR_16	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
65	FRANIGWIWTR_15	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
66	FRANIGWIWTR_14	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
67	FRANIGWIWTR_12	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
68	FRANIGWIWTR_11	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
69	FRANIGWIWTR_10	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
70	FRANIGWIWTR_1	WI	44.08435	-89.32025	White River Fishery Area	0.00001	0.00001	0.99997	0.00001	Wisconsin
71	FRANIGMITAM_9	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.894077	0.017937	0.087977	0.00001	West
72	FRANIGMITAM_8	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.911665	0.00001	0.065919	0.022406	West
73	FRANIGMITAM_7	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.798238	0.134573	0.067179	0.00001	West
74	FRANIGMITAM_4	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.906524	0.00001	0.093456	0.00001	West
75	FRANIGMITAM_3	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.814111	0.073637	0.095112	0.01714	West
76	FRANIGMITAM_20	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.817264	0.087225	0.052079	0.043432	West
77	FRANIGMITAM_2	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.724631	0.148208	0.127151	0.00001	West
78	FRANIGMITAM_18	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.779379	0.100965	0.099096	0.02056	West
79	FRANIGMITAM_17	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.863871	0.00001	0.102481	0.033638	West
80	FRANIGMITAM_16	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.931582	0.00001	0.068398	0.00001	West
81	FRANIGMITAM_15	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.904519	0.00001	0.071659	0.023812	West
82	FRANIGMITAM_14	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.964363	0.00001	0.010342	0.025284	West
83	FRANIGMITAM_13	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.901738	0.00001	0.086839	0.011413	West
84	FRANIGMITAM_12	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.754246	0.171352	0.051923	0.022479	West
85	FRANIGMITAM_11	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.917717	0.00001	0.082263	0.00001	West
86	FRANIGMITAM_10	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.800725	0.058491	0.047851	0.092933	West
87	FRANIGMITAM_1	MI	42.7283	-85.0546	Tamarack Lake	0.764602	0.08971	0.111947	0.033741	West
88	FRANIGON_202330157	ON	50.009705	-85.037005	Hearst	0.835974	0.033486	0.066616	0.063925	West
89	FRANIGON_202330158	ON	50.01071	-85.03427	Hearst	0.824523	0.038183	0.080733	0.05656	West

90	FRANIGON_202330155	ON	49.858446	-83.956537	Hearst	0.874862	0.006459	0.089621	0.029059	West
91	FRANIGON_202330156	ON	49.986523	-83.877965	Hearst	0.840244	0.00001	0.088188	0.071558	West
92	FRANIGON_942069	ON	46.73903	-84.13387	Searchmont	0.644298	0.20974	0.074962	0.071	West
93	FRANIGON_942070	ON	46.74247	-84.12101	Searchmont	0.69653	0.197935	0.073562	0.031973	West
94	FRANIGON_942071	ON	46.74276	-84.12061	Searchmont	0.700449	0.126711	0.104216	0.068625	West
95	FRANIGON_942080	ON	46.74244	-84.12016	Searchmont	0.790542	0.060896	0.03526	0.113302	West
96	FRANIGON_942072	ON	46.74324	-84.12006	Searchmont	0.885134	0.00001	0.016045	0.098811	West
97	FRANIGON_942075	ON	46.74445	-84.11833	Searchmont	0.61516	0.220464	0.09366	0.070717	West
98	FRANIGON_942082	ON	46.74622	-84.10114	Searchmont	0.666958	0.00001	0.170641	0.162391	West
99	FRANIGON_942508	ON	46.77506	-84.03645	Searchmont	0.636039	0.22453	0.106055	0.033375	West
100	FRANIGON_941888	ON	46.37004	-83.47245	Little Rapids	0.86457	0.060707	0.027188	0.047536	West
101	FRANIGON_202330159	ON	47.881695	-82.660624	Sudbury	0.837116	0.072584	0.049394	0.040906	West
102	FRANIGON_202330127	ON	48.179959	-82.543544	Foleyet	0.82406	0.070627	0.101542	0.003771	West
103	FRANIGON_202330126	ON	48.331264	-82.403996	Foleyet	0.958347	0.00001	0.020194	0.021449	West
104	FRANIGON_941949	ON	41.9234648	-82.5074966	Point Pelee National Park, Redbud Trail	0.840871	0.034548	0.061279	0.063302	West
105	FRANIGON_942675	ON	41.92	-82.5	Pointe Pelee National Park	0.917764	0.00001	0.00001	0.082216	West
106	FRANIGON_942674	ON	41.92	-82.5	Pointe Pelee National Park	0.871594	0.00001	0.07597	0.052426	West
107	FRANIGON_202330160	ON	49.368766	-82.443326	Kapuskasing	0.811141	0.00001	0.09363	0.095219	West
108	FRANIGON_202330161	ON	49.400144	-82.038205	Fauquier-Strickland	0.790695	0.071915	0.049082	0.088307	West
109	FRANIGON_202230328	ON	42.639187	-81.817575	Mosa Forest	0.72793	0.161941	0.110118	0.00001	West
110	FRANIGON_202330141	ON	49.193871	-81.753412	Smooth Rock Falls	0.889538	0.00001	0.078259	0.032192	West
111	FRANIGON_202330139	ON	49.194988	-81.750285	Smooth Rock Falls	0.871887	0.035126	0.092978	0.00001	West
112	FRANIGON_202330140	ON	49.216315	-81.707779	Smooth Rock Falls	0.755242	0.143321	0.071379	0.030059	West
113	FRANIGON_202330138	ON	49.259864	-81.707302	Smooth Rock Falls	0.826602	0.061236	0.068067	0.044096	West
114	FRANIGON_202330209	ON	46.238928	-81.707817	Espanola	0.874965	0.044972	0.008321	0.071741	West
115	FRANIGON_202330210	ON	46.224298	-81.655451	Espanola	0.653281	0.148792	0.11659	0.081337	West
116	FRANIGON_942505	ON	45.92859	-80.55982	Grundy Lake	0.627062	0.255434	0.059135	0.058369	West
117	FRANIGON_942506	ON	45.91605	-80.55917	Grundy Lake	0.621268	0.243061	0.094958	0.040713	West
118	FRANIGON_944899	ON	44.34667	-79.78266	9th Line Essa - BCR Rail Line	0.783861	0.177008	0.027314	0.011817	West

119	FRANIGON_944894	ON	44.34676	-79.78265	9th Line Essa - BCR Rail Line	0.5907	0.207764	0.120815	0.080721	West
120	FRANIGON_K1701	ON	47.138006	-79.769766	Net Lake/Temagami north	0.786458	0.101766	0.00001	0.111766	West
121	FRANIGON_K1687	ON	47.572158	-79.566742	Sutton Bay	0.65291	0.198613	0.080568	0.067909	West
122	FRANIGON_942255	ON	46.168021	-79.197593	Chisolm	0.705448	0.110093	0.096629	0.08783	West
123	FRANIGON_942253	ON	46.166645	-79.196481	Chisolm	0.692688	0.099824	0.083995	0.123493	West
124	FRANIGON_942243	ON	46.169568	-79.194281	Chisolm	0.600655	0.247953	0.059705	0.091688	West
125	FRANIGON_942244	ON	46.16933	-79.194056	Chisolm	0.729707	0.054431	0.068652	0.147209	West
126	FRANIGON_942245	ON	46.169393	-79.193321	Chisolm	0.784348	0.069201	0.035233	0.111218	West
127	FRANIGON_942246	ON	46.169405	-79.192677	Chisolm	0.776144	0.075658	0.068906	0.079292	West
128	FRANIGON_942247	ON	46.169517	-79.192094	Chisolm	0.811205	0.065829	0.01723	0.105736	West
129	FRANIGON_942252	ON	46.168719	-79.191728	Chisolm	0.692496	0.080818	0.076124	0.150562	West
130	FRANIGON_942248	ON	46.169709	-79.191516	Chisolm	0.746873	0.113129	0.090821	0.049178	West
131	FRANIGON_942250	ON	46.168528	-79.190606	Chisolm	0.717418	0.06429	0.09178	0.126513	West
132	FRANIGON_942251	ON	46.168554	-79.189969	Chisolm	0.685685	0.11372	0.055045	0.14555	West
133	FRANIGON_202330208	ON	46.38142	-78.898637	Mattawan	0.728098	0.173614	0.030879	0.067409	West
134	FRANIGON_944896	ON	44.76724	-78.59449	Dutch Line Wetland, Kinmount	0.569749	0.339172	0.044964	0.046115	West
135	FRANIGON_944895	ON	45.20655	-77.92971	Bader #1 - 32361 Hwy 62	0.68495	0.197314	0.064827	0.052909	West
136	FRANIGON_944900	ON	46.072636	-77.465013	Big Rat Lake, Deep River	0.482478	0.359166	0.115237	0.04312	West
137	FRANIGON_944902	ON	46.072787	-77.464388	Big Rat Lake, Deep River	0.576471	0.265508	0.087891	0.07013	West
138	FRANIGON_944901	ON	45.739842	-77.164743	831 Witt Road, Davis Mills	0.75002	0.132644	0.043484	0.073852	West
139	FRANIGON_944903	ON	45.62309	-77.05203	Bulger Road, Micksburg	0.574456	0.301507	0.108198	0.015839	West
140	FRANIGON_942519	ON	45.274026	-76.797933	6250 Calabogie Road, Calabogie	0.597592	0.293026	0.073846	0.035535	West
141	FRANIGON_944898	ON	45.24631	-76.76368	26 Barrett Chute Road, Calabogie	0.62719	0.292372	0.003268	0.07717	West
142	FRANIGON_941893	ON	44.35812	-76.07124	Landon Bay	0.598858	0.280427	0.075738	0.044977	West
143	FRANIGON_941892	ON	44.35258	-75.97523	Hill island	0.715431	0.131848	0.044793	0.107928	West
144	FRANIGQC_942054	QC	45.86521	-75.17525	Montpellier	0.652922	0.205653	0.060146	0.081279	West

145	FRANIGQC_942061	QC	45.90516	-75.17332	Montpellier	0.611413	0.265176	0.034919	0.088492	West
146	FRANIGQC_942055	QC	45.86084	-75.17226	Montpellier	0.588446	0.193166	0.06806	0.150329	West
147	FRANIGQC_942062	QC	45.90602	-75.17026	Montpellier	0.656515	0.226929	0.025854	0.090702	West
148	FRANIGQC_942059	QC	45.86047	-75.16908	Montpellier	0.604435	0.211722	0.053734	0.130108	West
149	FRANIGQC_942057	QC	45.86105	-75.16727	Montpellier	0.49058	0.32674	0.083509	0.099171	West
150	FRANIGQC_942063	QC	45.90625	-75.16529	Montpellier	0.628178	0.18614	0.061918	0.123764	West
151	FRANIGQC_942064	QC	45.90538	-75.16382	Montpellier	0.551739	0.270266	0.031829	0.146167	West
152	FRANIGQC_942066	QC	45.90355	-75.15561	Montpellier	0.637189	0.270954	0.054278	0.037579	West
153	FRANIGQC_942067	QC	45.90428	-75.1499	Montpellier	0.574847	0.277863	0.055842	0.091448	West
154	FRANIGQC_942068	QC	45.90387	-75.148	Montpellier	0.744772	0.163641	0.00001	0.091578	West
155	FRANIGQC_942060	QC	45.99537	-75.13609	Montpellier	0.54017	0.301089	0.06879	0.089952	West
156	FRANIGQC_941900	QC	45.093029	-73.977315	Orms town	0.683653	0.058271	0.158449	0.099627	West
157	FRANIGQC_941775	QC	45.39438	-73.72633	Kahnawake	0.596917	0.239647	0.025504	0.137932	West
158	FRANIGQC_941774	QC	45.39451	-73.72622	Kahnawake	0.675942	0.142908	0.087462	0.093688	West
159	FRANIGQC_941772	QC	45.39633	-73.72612	Kahnawake	0.585636	0.273396	0.042281	0.098688	West
160	FRANIGQC_941773	QC	45.39639	-73.72611	Kahnawake	0.592293	0.224196	0.092777	0.090734	West
161	FRANIGQC_941767	QC	45.38094	-73.68408	Kahnawake	0.612693	0.269272	0.059643	0.058392	West
162	FRANIGQC_941766	QC	45.38088	-73.68408	Kahnawake	0.5581	0.327928	0.04073	0.073242	West
163	FRANIGQC_941765	QC	45.38085	-73.67948	Kahnawake	0.801568	0.069881	0.066477	0.062074	West
164	FRANIGQC_941784	QC	45.366214	-73.666696	Kahnawake	0.579475	0.275684	0.00001	0.144831	West
165	FRANIGQC_941768	QC	45.37075	-73.66451	Kahnawake	0.437864	0.365303	0.055712	0.141121	West
166	FRANIGQC_941769	QC	45.37091	-73.66448	Kahnawake	0.411111	0.358994	0.101346	0.128549	West
167	FRANIGQC_941783	QC	45.370335	-73.662907	Kahnawake	0.563891	0.270212	0.077315	0.088582	West
168	FRANIGQC_941778	QC	45.36155	-73.64485	Kahnawake	0.720001	0.166399	0.03333	0.080269	West
169	FRANIGQC_941779	QC	45.36175	-73.64386	Kahnawake	0.681303	0.17385	0.068804	0.076043	West
170	FRANIGQC_941776	QC	45.3654	-73.64316	Kahnawake	0.513027	0.34462	0.036895	0.105458	West
171	FRANIGQC_941781	QC	45.36242	-73.64178	Kahnawake	0.610844	0.254315	0.049066	0.085775	West
172	FRANIGQC_941780	QC	45.36244	-73.64177	Kahnawake	0.472958	0.301766	0.115527	0.109748	West
173	FRANIGQC_941760	QC	45.38467	-73.63756	Kahnawake	0.652057	0.256831	0.030936	0.060176	West
174	FRANIGQC_941788	QC	45.383515	-73.633998	Kahnawake	0.627228	0.213569	0.05359	0.105613	West
175	FRANIGQC_941786	QC	45.382853	-73.633483	Kahnawake	0.639825	0.190251	0.049471	0.120453	West

176	FRANIGQC_941761	QC	45.38256	-73.63324	Kahnawake	0.627399	0.247387	0.037103	0.08811	West
177	FRANIGQC_941762	QC	45.38491	-73.63141	Kahnawake	0.670979	0.232427	0.00001	0.096584	West
178	FRANIGQC_941782	QC	45.38058	-73.62758	Kahnawake	0.530191	0.344926	0.056074	0.068808	West
179	FRANIGQC_941770	QC	45.38058	-73.62737	Kahnawake	0.730141	0.078881	0.057248	0.133731	West
180	FRANIGQC_941790	QC	45.37638	-73.626262	Kahnawake	0.655927	0.144039	0.072727	0.127307	West
181	FRANIGQC_944889	QC	45.2359	-73.377	Kahnawake	0.416365	0.489525	0.053487	0.040623	East
182	FRANIGQC_944884	QC	45.2225	-73.4024	Lafleur Golf, Kahnawake	0.439419	0.411127	0.134753	0.0147	West
183	FRANIGQC_944887	QC	45.245	-73.396	Adirondack Jct., Kahnawake	0.54046	0.314831	0.083389	0.061319	West
184	FRANIGQC_944890	QC	45.241	-73.3855	Adirondack Jct., Kahnawake	0.558551	0.347567	0.038418	0.055464	West
185	FRANIGQC_942044	QC	47.02471	-73.08133	Saint-Armand	0.434949	0.427321	0.00001	0.137721	West
186	FRANIGQC_942045	QC	45.02484	-73.08113	Saint-Armand	0.468312	0.388534	0.054624	0.08853	West
187	FRANIGQC_942051	QC	45.02571	-73.08077	Saint-Armand	0.42882	0.39787	0.084579	0.088732	West
188	FRANIGQC_942050	QC	45.02589	-73.08077	Saint-Armand	0.433597	0.462463	0.027593	0.076347	East
189	FRANIGQC_942052	QC	45.02547	-73.08074	Saint-Armand	0.386814	0.472704	0.034473	0.106009	East
190	FRANIGQC_942049	QC	45.02511	-73.08059	Saint-Armand	0.453699	0.438526	0.055929	0.051846	West
191	FRANIGQC_942046	QC	45.0262	-73.08027	Saint-Armand	0.445367	0.531868	0.00001	0.022756	East
192	FRANIGQC_942047	QC	45.02657	-73.08015	Saint-Armand	0.450231	0.425469	0.034483	0.089816	West
193	FRANIGQC_942048	QC	45.264	-73.08006	Saint-Armand	0.594472	0.307223	0.060556	0.037749	West
194	FRANIGQC_MAU06	QC	46.74228	-72.7855	Parc de la Mauricie	0.625694	0.251599	0.035511	0.087196	West
195	FRANIGQC_MAU05	QC	46.74228	-72.7855	Parc de la Mauricie	0.510695	0.360412	0.05177	0.077122	West
196	FRANIGQC_MAU04	QC	46.74228	-72.7855	Parc de la Mauricie	0.530798	0.321153	0.057804	0.090245	West
197	FRANIGQC_MAU12	QC	46.74402	-72.78177	Parc de la Mauricie	0.568276	0.310724	0.00001	0.12099	West
198	FRANIGQC_MAU10	QC	46.74402	-72.78177	Parc de la Mauricie	0.484297	0.418344	0.066429	0.030931	West
199	FRANIGQC_MAU09	QC	46.7434	-72.78145	Parc de la Mauricie	0.554871	0.359263	0.060361	0.025505	West
200	FRANIGQC_MAU08	QC	46.7434	-72.78145	Parc de la Mauricie	0.574087	0.31202	0.055677	0.058216	West
201	FRANIGQC_MAU07	QC	46.7434	-72.78145	Parc de la Mauricie	0.637163	0.235011	0.011931	0.115896	West
202	FRANIGQC_MAU03	QC	46.74066	-72.78082	Parc de la Mauricie	0.661363	0.281117	0.014087	0.043432	West
203	FRANIGQC_MAU02	QC	46.74066	-72.78082	Parc de la Mauricie	0.543779	0.325463	0.059928	0.070829	West
204	FRANIGQC_942039	QC	46.29604	-72.51552	Saint-Grégoire	0.643161	0.21934	0.052942	0.084557	West

205	FRANIGQC_944673	QC	48.58799	-72.50227	Saint-Félicien	0.488163	0.500576	0.011251	0.00001	East
206	FRANIGQC_944672	QC	48.58799	-72.50227	Saint-Félicien	0.425479	0.538977	0.033502	0.002041	East
207	FRANIGQC_FELICIEN02	QC	48.58751	-72.50171	Saint-Félicien	0.596855	0.327528	0.015248	0.060369	West
208	FRANIGQC_FELICIEN01	QC	48.58786	-72.50149	Saint-Félicien	0.543721	0.357392	0.078528	0.020359	West
209	FRANIGQC_BAT03	QC	46.55865	-72.41509	Batiscan	0.588845	0.282599	0.086212	0.042344	West
210	FRANIGQC_BAT06	QC	46.58042	-72.41307	Batiscan	0.565739	0.320412	0.019168	0.094682	West
211	FRANIGQC_BAT05	QC	46.58042	-72.41307	Batiscan	0.439467	0.290331	0.071438	0.198764	West
212	FRANIGQC_BAT04	QC	46.58042	-72.41307	Batiscan	0.510779	0.321669	0.04204	0.125512	West
213	FRANIGQC_BEC06	QC	46.35117	-72.39238	Bécancour	0.470924	0.330899	0.058124	0.140052	West
214	FRANIGQC_BEC05	QC	46.35117	-72.39238	Bécancour	0.668752	0.20828	0.060711	0.062256	West
215	FRANIGQC_BEC03	QC	46.34786	-72.3923	Bécancour	0.560094	0.281096	0.076472	0.082339	West
216	FRANIGQC_BEC02	QC	46.34786	-72.3923	Bécancour	0.553303	0.256848	0.089835	0.100014	West
217	FRANIGQC_BEC01	QC	46.34786	-72.3923	Bécancour	0.485927	0.242651	0.150177	0.121246	West
218	FRANIGQC_ORF06	QC	45.37146	-72.14763	Orford	0.746222	0.166121	0.00001	0.087646	West
219	FRANIGQC_ORF05	QC	45.37146	-72.14763	Orford	0.523786	0.299892	0.057032	0.11929	West
220	FRANIGQC_ORF04	QC	45.37146	-72.14763	Orford	0.634913	0.258768	0.076759	0.029561	West
221	FRANIGQC_ORF03	QC	45.37198	-72.14715	Orford	0.404287	0.451935	0.041695	0.102083	East
222	FRANIGQC_ORF02	QC	45.37198	-72.14715	Orford	0.611069	0.278817	0.050939	0.059175	West
223	FRANIGQC_ORF01	QC	45.37198	-72.14715	Orford	0.536754	0.363816	0.067703	0.031727	West
224	FRANIGQC_META01	QC	48.37235	-71.84888	Métabetchouan	0.523035	0.433438	0.043517	0.00001	West
225	FRANIGQC_944658	QC	48.34713	-71.79028	Lac à la Croix	0.562811	0.351541	0.005704	0.079944	West
226	FRANIGQC_944659	QC	48.36335	-71.72449	Lac à la Croix	0.508877	0.405121	0.003363	0.082639	West
227	FRANIGQC_ZOVAL03	QC	46.91851	-71.59424	Valcartier	0.424068	0.433324	0.050819	0.091789	East
228	FRANIGQC_ZOVAL02	QC	46.91851	-71.59424	Valcartier	0.556378	0.320824	0.099124	0.023674	West
229	FRANIGQC_ZOVAL01	QC	46.91851	-71.59424	Valcartier	0.467487	0.396322	0.065866	0.070326	West
230	FRANIGQC_CHARNY01	QC	46.70021	-71.267671	Charny	0.482414	0.400397	0.055321	0.061868	West
231	FRANIGQC_CHARNY02	QC	46.702791	-71.262081	Charny	0.517024	0.412552	0.00001	0.070414	West
232	FRANIGQC_942041	QC	46.76877	-71.207	Lévis	0.519608	0.394221	0.012713	0.073459	West
233	FRANIGNHEPP_8	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.479103	0.3417	0.054416	0.124781	West
234	FRANIGNHEPP_7	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.642355	0.210393	0.076481	0.070771	West
235	FRANIGNHEPP_6	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.55941	0.335092	0.07289	0.032609	West

236	FRANIGNHEPP_5	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.427983	0.412656	0.079499	0.079862	West
237	FRANIGNHEPP_3	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.504849	0.419224	0.074637	0.00129	West
238	FRANIGNHEPP_20	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.629724	0.325313	0.03326	0.011703	West
239	FRANIGNHEPP_2	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.4975	0.340966	0.040385	0.12115	West
240	FRANIGNHEPP_19	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.569241	0.375762	0.054988	0.00001	West
241	FRANIGNHEPP_17	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.658359	0.251577	0.044736	0.045328	West
242	FRANIGNHEPP_16	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.499304	0.34451	0.133698	0.022488	West
243	FRANIGNHEPP_15	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.460503	0.401247	0.050861	0.08739	West
244	FRANIGNHEPP_14	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.43069	0.4512	0.088931	0.029178	East
245	FRANIGNHEPP_13	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.628398	0.251655	0.00001	0.119937	West
246	FRANIGNHEPP_12	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.481907	0.401326	0.086194	0.030573	West
247	FRANIGNHEPP_11	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.419338	0.413786	0.057072	0.109804	West
248	FRANIGNHEPP_10	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.471563	0.512461	0.015966	0.00001	East
249	FRANIGNHEPP_1	NH	43.05942	-71.11518	Epping	0.675598	0.279951	0.007933	0.036518	West
250	FRANIGQC_FUL01	QC	48.459746	-70.993425	St-Fulgence	0.599867	0.305541	0.040193	0.054399	West
251	FRANIGQC_FUL02	QC	48.459676	-70.991675	St-Fulgence	0.580643	0.416687	0.00001	0.00266	West
252	FRANIGQC_MEG03	QC	45.43251	-70.87841	Lac Mégantic	0.36725	0.478584	0.04516	0.109006	East
253	FRANIGQC_MEG02	QC	45.43251	-70.87841	Lac Mégantic	0.447193	0.494306	0.042965	0.015536	East
254	FRANIGQC_MEG01	QC	45.43251	-70.87841	Lac Mégantic	0.506793	0.344394	0.040322	0.10849	West
255	FRANIGQC_MEG06	QC	45.43278	-70.87779	Lac Mégantic	0.501135	0.467296	0.031559	0.00001	West
256	FRANIGQC_MEG05	QC	45.43278	-70.87779	Lac Mégantic	0.478549	0.422269	0.099171	0.00001	West
257	FRANIGQC_MEG04	QC	45.43278	-70.87779	Lac Mégantic	0.548419	0.412608	0.015731	0.023242	West
258	FRANIGQC_944661	QC	45.9609	-70.72952	Saint-Martin de Beauce	0.52576	0.464704	0.009526	0.00001	West
259	FRANIGQC_SMAR03	QC	45.96086	-70.72931	St-Martin-de-Beauce	0.482757	0.437543	0.032324	0.047376	West
260	FRANIGQC_SMAR02	QC	45.96086	-70.72931	St-Martin-de-Beauce	0.500888	0.499092	0.00001	0.00001	West
261	FRANIGQC_SMAR01	QC	45.96086	-70.72931	St-Martin-de-Beauce	0.426952	0.53358	0.039457	0.00001	East
262	FRANIGQC_SMAR06	QC	45.96153	-70.72855	St-Martin-de-Beauce	0.412504	0.511634	0.075852	0.00001	East
263	FRANIGQC_SMAR05	QC	45.96153	-70.72855	St-Martin-de-Beauce	0.491001	0.443814	0.052275	0.01291	West
264	FRANIGQC_SMAR04	QC	45.96153	-70.72855	St-Martin-de-Beauce	0.354364	0.622295	0.023331	0.00001	East
265	FRANIGMEMTL_9	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.332313	0.571301	0.04698	0.049406	East

266	FRANIGMEMTL_8	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.240636	0.622382	0.066614	0.070368	East
267	FRANIGMEMTL_7	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.122805	0.719779	0.105515	0.051901	East
268	FRANIGMEMTL_6	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.172367	0.68463	0.067932	0.075071	East
269	FRANIGMEMTL_5	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.317845	0.600343	0.050064	0.031748	East
270	FRANIGMEMTL_4	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.193886	0.547342	0.061311	0.197461	East
271	FRANIGMEMTL_3	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.231994	0.684544	0.083451	0.00001	East
272	FRANIGMEMTL_20	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.098921	0.763947	0.057917	0.079215	East
273	FRANIGMEMTL_2	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.181069	0.671241	0.067433	0.080256	East
274	FRANIGMEMTL_19	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.163285	0.704706	0.061322	0.070686	East
275	FRANIGMEMTL_18	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.530471	0.386214	0.067745	0.01557	West
276	FRANIGMEMTL_17	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.466942	0.458286	0.05491	0.019863	West
277	FRANIGMEMTL_16	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.280719	0.661935	0.017853	0.039492	East
278	FRANIGMEMTL_15	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.300037	0.563811	0.055341	0.08081	East
279	FRANIGMEMTL_13	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.331648	0.582084	0.00001	0.086258	East
280	FRANIGMEMTL_12	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.172753	0.669842	0.049452	0.107953	East
281	FRANIGMEMTL_11	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.335977	0.454674	0.024912	0.184438	East
282	FRANIGMEMTL_10	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.187881	0.662033	0.069877	0.080209	East
283	FRANIGMEMTL_1	ME	46.6185582	-68.4698546	Mikmaq Trust	0.289637	0.5473	0.104956	0.058107	East
284	FRANIGNB_942486	NB	45.83489	-67.72508	North Lake	0.204984	0.616965	0.067978	0.110072	East
285	FRANIGNB_942488	NB	45.83439	-67.72462	North Lake	0.21848	0.658718	0.111042	0.011759	East
286	FRANIGNB_942487	NB	45.83425	-67.72417	North Lake	0.204396	0.698964	0.052737	0.043903	East
287	FRANIGNB_942497	NB	46.9604	-67.67229	Salmon river, Tobique	0.337632	0.533098	0.038644	0.090626	East
288	FRANIGNB_944830	NB	46.960277	-67.671957	Salmon river, Undine	0.341801	0.506217	0.035098	0.116883	East
289	FRANIGNB_944828	NB	46.960277	-67.671957	Salmon river, Undine	0.170359	0.650583	0.047721	0.131337	East
290	FRANIGNB_944826	NB	46.960277	-67.671957	Salmon river, Undine	0.260829	0.599501	0.060308	0.079362	East
291	FRANIGNB_942265	NB	46.47671	-67.57418	Shiktehawk Walking Trail	0.198326	0.639087	0.051319	0.111269	East
292	FRANIGNB_942267	NB	46.47655	-67.57368	Shiktehawk Walking Trail	0.255645	0.638679	0.076921	0.028756	East
293	FRANIGNB_942268	NB	46.4765	-67.5731	Shiktehawk Walking Trail	0.001146	0.835357	0.116633	0.046864	East
294	FRANIGNB_942269	NB	46.47687	-67.57283	Shiktehawk Walking Trail	0.15662	0.78232	0.06105	0.00001	East

295	FRANIGNB_942271	NB	46.47609	-67.57252	Shiktehawk Walking Trail	0.074196	0.787284	0.085043	0.053477	East
296	FRANIGNB_942270	NB	46.47658	-67.57239	Shiktehawk Walking Trail	0.317669	0.548508	0.030065	0.103758	East
297	FRANIGNB_942272	NB	46.47584	-67.5719	Shiktehawk Walking Trail	0.333469	0.552055	0.07376	0.040716	East
298	FRANIGNB_942273	NB	46.47552	-67.57138	Shiktehawk Walking Trail	0.365648	0.451832	0.05779	0.124731	East
299	FRANIGNB_942274	NB	46.47544	-67.5707	Shiktehawk Walking Trail	0.176283	0.608222	0.047512	0.167983	East
300	FRANIGNB_944836	NB	45.98722	-67.22722	NA	0.197775	0.693598	0.00001	0.108617	East
301	FRANIGNB_944874	NB	45.93166589	-67.099742	NA	0.235498	0.656322	0.044629	0.06355	East
302	FRANIGNB_942542	NB	47.71576	-66.16293	NA	0.24875	0.676506	0.003693	0.071052	East
303	FRANIGNB_942541	NB	47.6166	-66.1468	NA	0.252123	0.643818	0.051291	0.052768	East
304	FRANIGNB_941861	NB	45.83961	-67.05046	George Lake	0.182907	0.754847	0.022394	0.039852	East
305	FRANIGNB_942498	NB	45.64521	-67.00603	Lane 4, Tweedside	0.233409	0.671075	0.00001	0.095506	East
306	FRANIGNB_942258	NB	46.2616	-66.6435	Cross Creek Station	0.386441	0.488635	0.056447	0.068477	East
307	FRANIGNB_942257	NB	46.2753	-66.6432	Cross Creek Station	0.17241	0.729887	0.041331	0.056373	East
308	FRANIGNB_942428	NB	46.26609	-66.64274	Cross Creek Station	0.258865	0.595833	0.023065	0.122237	East
309	FRANIGNB_942426	NB	46.26713	-66.64182	Cross Creek Station	0.173455	0.740357	0.036789	0.049399	East
310	FRANIGNB_942432	NB	46.26793	-66.64137	Cross Creek Station	0.248615	0.684842	0.047419	0.019124	East
311	FRANIGNB_942429	NB	46.26798	-66.64098	Cross Creek Station	0.079884	0.85347	0.020528	0.046117	East
312	FRANIGNB_942430	NB	46.2683	-66.64079	Cross Creek Station	0.186112	0.639726	0.07286	0.101303	East
313	FRANIGNB_942427	NB	46.26867	-66.64059	Cross Creek Station	0.256678	0.638315	0.010581	0.094426	East
314	FRANIGNB_942504	NB	45.87706	-66.59675	Vanier Highway	0.167006	0.709675	0.018271	0.105048	East
315	FRANIGNB_942502	NB	45.87708	-65.59682	Vanier Highway	0.164702	0.712512	0.021586	0.1012	East
316	FRANIGNB_942493	NB	46.5063	-66.30212	McNamee	0.292563	0.645836	0.03359	0.02801	East
317	FRANIGNB_942495	NB	46.50686	-66.3005	McNamee	0.165611	0.680355	0.072072	0.081962	East
318	FRANIGNB_942496	NB	46.50915	-66.28577	McNamee	0.119638	0.773268	0.043596	0.063498	East
319	FRANIGNB_944825	NB	46.67019	-66.27232	Boars Head Narrows	0.181192	0.654959	0.071053	0.092796	East
320	FRANIGNB_942492	NB	46.67009	-66.2721	Boars Head Narrows	0.153161	0.696362	0.038404	0.112073	East
321	FRANIGNB_942489	NB	46.66888	-66.26701	Boars Head Narrows	0.145759	0.777711	0.029037	0.047493	East
322	FRANIGNB_942490	NB	46.66901	-66.2659	Boars Head Narrows	0.149192	0.733529	0.04287	0.074409	East

323	FRANIGNB_942491	NB	46.67005	-66.26407	Boars Head Narrows	0.142704	0.766647	0.039715	0.050933	East
324	FRANIGNB_944824	NB	46.67623	-66.25687	Boars Head Narrows	0.104049	0.772216	0.054272	0.069463	East
325	FRANIGNB_942526	NB	47.66817	-66.22122	Jacquet River Gorge	0.129403	0.700433	0.048853	0.12131	East
326	FRANIGNB_942264	NB	47.6758	-66.21797	Jacquet River Gorge	0.234053	0.638769	0.066887	0.060291	East
327	FRANIGNB_942263	NB	47.67648	-66.21779	Jacquet River Gorge	0.211053	0.698441	0.021937	0.068569	East
328	FRANIGNB_942262	NB	47.67669	-66.21754	Jacquet River Gorge	0.40012	0.586185	0.013685	0.00001	East
329	FRANIGNB_942410	NB	47.71868	-66.16478	Jacquet River Gorge	0.287405	0.623484	0.009785	0.079326	East
330	FRANIGNB_942524	NB	47.71544	-66.1645	Jacquet River Gorge	0.020216	0.979764	0.00001	0.00001	East
331	FRANIGNB_942409	NB	47.71544	-66.1645	Jacquet River Gorge	0.00001	0.983342	0.00001	0.016638	East
332	FRANIGNB_942414	NB	47.71465	-66.16379	Jacquet River Gorge	0.162275	0.697197	0.036117	0.104411	East
333	FRANIGNB_942515	NB	47.71465	-66.16376	Jacquet River Gorge	0.230284	0.699027	0.00001	0.070678	East
334	FRANIGNB_942516	NB	47.71555	-66.16358	Jacquet River Gorge	0.145248	0.776939	0.062859	0.014954	East
335	FRANIGNB_942411	NB	47.71534	-66.16327	Jacquet River Gorge	0.00001	0.900875	0.060821	0.038294	East
336	FRANIGNB_942412	NB	47.71576	-66.16293	Jacquet River Gorge	0.230674	0.637919	0.033303	0.098103	East
337	FRANIGNB_944833	NB	47.71923	-66.16225	Jacquet River Gorge	0.296471	0.57093	0.005715	0.126884	East
338	FRANIGNB_942415	NB	47.71959	-66.16212	Jacquet River Gorge	0.243779	0.66864	0.028697	0.058885	East
339	FRANIGNB_942527	NB	47.71935	-66.16105	Jacquet River Gorge	0.260351	0.546847	0.057413	0.135389	East
340	FRANIGNB_942529	NB	47.71953	-66.16062	Jacquet River Gorge	0.182471	0.712206	0.063599	0.041725	East
341	FRANIGNB_942423	NB	46.9173	-65.95961	Harris Brooke Settlement	0.238243	0.712165	0.016351	0.033241	East
342	FRANIGNB_942418	NB	46.91775	-65.9595	Harris Brooke Settlement	0.133916	0.712989	0.063324	0.089772	East
343	FRANIGNB_942417	NB	46.91854	-65.9587	Harris Brooke Settlement	0.256116	0.657947	0.067533	0.018404	East
344	FRANIGNB_942422	NB	46.91744	-65.95845	Harris Brooke Settlement	0.122889	0.739724	0.022034	0.115353	East
345	FRANIGNB_942425	NB	46.91801	-65.95842	Harris Brooke Settlement	0.16972	0.713989	0.007675	0.108616	East
346	FRANIGNB_942424	NB	46.91768	-65.95826	Harris Brooke Settlement	0.049028	0.886805	0.031082	0.033085	East
347	FRANIGNB_942416	NB	46.91943	-65.95807	Harris Brooke Settlement	0.15525	0.668905	0.102598	0.073247	East
348	FRANIGNB_942546	NB	46.940567	-65.92583	Halcomb	0.013822	0.901165	0.019792	0.065222	East
349	FRANIGNB_942543	NB	46.940967	-65.925317	Halcomb	0.089587	0.81441	0.079168	0.016836	East

350	FRANIGNB_942545	NB	46.9658	-65.831667	Sunny Corner	0.08058	0.835463	0.026288	0.057669	East
351	FRANIGNB_942510	NB	46.44757	-65.28515	Rogersville, Young Ridge Road	0.252348	0.628922	0.047551	0.071179	East
352	FRANIGNB_942260	NB	45.96397	-65.19843	Intervale	0.315278	0.544106	0.029626	0.11099	East
353	FRANIGNB_942261	NB	45.96351	-65.1983	Intervale	0.213619	0.679674	0.03229	0.074417	East
354	FRANIGNB_942402	NB	45.97283	-65.19771	Intervale	0.214374	0.718126	0.00001	0.06749	East
355	FRANIGNB_942406	NB	45.97309	-65.19698	Intervale	0.117356	0.762303	0.023408	0.096933	East
356	FRANIGNB_942404	NB	45.92728	-65.19695	Intervale	0.184034	0.698064	0.00001	0.117892	East
357	FRANIGNB_942408	NB	45.9743	-65.19672	Intervale	0.162451	0.677932	0.078332	0.081284	East
358	FRANIGNB_942259	NB	45.97358	-65.19659	Intervale	0.143545	0.717085	0.00001	0.139361	East
359	FRANIGNB_942407	NB	45.97332	-65.19645	Intervale	0.22832	0.602815	0.080612	0.088253	East
360	FRANIGNS_942341	NS	44.37621	-65.19788	Kejimkujik National Park	0.304032	0.556811	0.061067	0.078089	East
361	FRANIGNS_942340	NS	44.37594	-65.1977	Kejimkujik National Park	0.279843	0.562162	0.045973	0.112023	East
362	FRANIGNS_942342	NS	44.36857	-65.19666	Kejimkujik National Park	0.404639	0.510763	0.00001	0.084587	East
363	FRANIGNS_942345	NS	44.36851	-65.19639	Kejimkujik National Park	0.404425	0.556161	0.012041	0.027373	East
364	FRANIGNS_942343	NS	44.36546	-65.19558	Kejimkujik National Park	0.253978	0.637966	0.088311	0.019745	East
365	FRANIGNS_942346	NS	44.36286	-65.18671	Kejimkujik National Park	0.056085	0.879698	0.064208	0.00001	East
366	FRANIGNS_942347	NS	44.36272	-65.1866	Kejimkujik National Park	0.084895	0.764661	0.107985	0.042459	East
367	FRANIGNS_942348	NS	44.36267	-65.18632	Kejimkujik National Park	0.025858	0.906788	0.037268	0.030086	East
368	FRANIGNS_942349	NS	44.36288	-65.18589	Kejimkujik National Park	0.147331	0.742643	0.078413	0.031613	East
369	FRANIGNB_942501	NB	46.45656	-65.12016	Emerson Road, Kent	0.085417	0.854789	0.00001	0.059784	East
370	FRANIGNB_942500	NB	46.45645	-65.11906	Emerson Road, Kent	0.265571	0.683865	0.021262	0.029303	East
371	FRANIGNS_942304	NS	44.33121	-64.89789	Ponhook	0.291728	0.613801	0.025692	0.068778	East
372	FRANIGNS_942303	NS	44.33151	-64.89772	Ponhook	0.109758	0.793032	0.040268	0.056942	East
373	FRANIGNS_942298	NS	44.33106	-64.89761	Ponhook	0.236184	0.717467	0.045794	0.000555	East
374	FRANIGNS_942302	NS	44.33174	-64.89743	Ponhook	0.152447	0.722964	0.026046	0.098543	East
375	FRANIGNS_942300	NS	44.3315	-64.89736	Ponhook	0.170878	0.735051	0.007469	0.086602	East

376	FRANIGNS_942297	NS	44.33122	-64.89732	Ponhook	0.280183	0.51937	0.08333	0.117117	East
377	FRANIGNS_942301	NS	44.33151	-64.89707	Ponhook	0.350333	0.601467	0.007195	0.041006	East
378	FRANIGNS_942296	NS	44.33128	-64.89695	Ponhook	0.073819	0.828128	0.015549	0.082504	East
379	FRANIGNS_942293	NS	44.33075	-64.89588	Ponhook	0.091056	0.695622	0.074516	0.138807	East
380	FRANIGNS_942292	NS	44.33091	-64.89566	Ponhook	0.1198	0.775695	0.018201	0.086304	East
381	FRANIGNS_942294	NS	44.33065	-64.89565	Ponhook	0.069514	0.76498	0.036493	0.129013	East
382	FRANIGNS_942295	NS	44.33026	-64.89536	Ponhook	0.275625	0.669407	0.00001	0.054958	East
383	FRANIGNS_942360	NS	45.05337	-64.48849	New Minas	0.215456	0.695562	0.059464	0.029518	East
384	FRANIGNS_942361	NS	45.05345	-64.48823	New Minas	0.136366	0.750659	0.042694	0.070281	East
385	FRANIGNS_942363	NS	45.05356	-64.48787	New Minas	0.062022	0.78223	0.049804	0.105944	East
386	FRANIGNS_942362	NS	45.05356	-64.48787	New Minas	0.066112	0.814439	0.037058	0.082391	East
387	FRANIGNS_942364	NS	45.05348	-64.48747	New Minas	0.00001	0.900678	0.04726	0.052052	East
388	FRANIGNS_942366	NS	45.05365	-64.48728	New Minas	0.053192	0.784794	0.062719	0.099295	East
389	FRANIGNS_942368	NS	45.05346	-64.48644	New Minas	0.161248	0.712451	0.03216	0.094142	East
390	FRANIGNS_942369	NS	45.05355	-64.48604	New Minas	0.00001	0.866348	0.071505	0.062136	East
391	FRANIGNS_942370	NS	45.05345	-64.48575	New Minas	0.263985	0.617181	0.012283	0.10655	East
392	FRANIGNS_942371	NS	45.05345	-64.48539	New Minas	0.110415	0.759319	0.027264	0.103002	East
393	FRANIGNS_942373	NS	45.05392	-64.48537	New Minas	0.120629	0.668764	0.045161	0.165445	East
394	FRANIGNS_942372	NS	45.05339	-64.48511	New Minas	0.257648	0.575963	0.00001	0.166379	East
395	FRANIGNS_202210283	NS	45.0535193	-64.4875525	Kentville	0.014287	0.868947	0.064251	0.052514	East
396	FRANIGNS_202210284	NS	45.053808	-64.4872572	Kentville	0.00001	0.845027	0.07542	0.079544	East
397	FRANIGNS_202210282	NS	45.0535114	-64.4867303	Kentville	0.013057	0.829467	0.069739	0.087737	East
398	FRANIGNS_942351	NS	45.04437	-64.4253	Gaspereau	0.00001	0.00001	0.00001	0.99997	Gaspereau
399	FRANIGNS_942354	NS	45.04391	-64.42454	Gaspereau	0.00001	0.00001	0.00001	0.99997	Gaspereau
400	FRANIGNS_942353	NS	45.04369	-64.42429	Gaspereau	0.00001	0.00001	0.00001	0.99997	Gaspereau
401	FRANIGNS_942355	NS	45.044	-64.42419	Gaspereau	0.00001	0.701817	0.00001	0.298163	East
402	FRANIGNS_942352	NS	45.04396	-64.42397	Gaspereau	0.085748	0.653844	0.038113	0.222296	East
403	FRANIGNS_942356	NS	45.04406	-64.42393	Gaspereau	0.185447	0.552333	0.033587	0.228633	East
404	FRANIGNS_942357	NS	45.04433	-64.42349	Gaspereau	0.00001	0.00001	0.00001	0.99997	Gaspereau

405	FRANIGNS_942359	NS	45.04414	-64.4232	Gaspereau	0.00001	0.00001	0.00001	0.99997	Gaspereau
406	FRANIGNS_942358	NS	45.04426	-64.42315	Gaspereau	0.00001	0.00001	0.00001	0.99997	Gaspereau
407	FRANIGNS_942350	NS	45.0444	-64.42284	Gaspereau	0.00001	0.00001	0.00001	0.99997	Gaspereau
408	FRANIGNS_202210281	NS	45.0268121	-64.0810505	Poplar Grove	0.084253	0.740866	0.096117	0.078764	East
409	FRANIGNS_202210280	NS	45.0268094	-64.0807707	Poplar Grove	0.09762	0.707154	0.059973	0.135252	East
410	FRANIGNS_202210279	NS	45.0268094	-64.0807707	Poplar Grove	0.00001	0.849338	0.059534	0.091118	East
411	FRANIGNS_202210277	NS	45.0268094	-64.0807707	Poplar Grove	0.00001	0.837835	0.073451	0.088705	East
412	FRANIGNS_942275	NS	45.02837	-64.07987	Poplar Grove	0.006763	0.915202	0.031808	0.046228	East
413	FRANIGNS_942277	NS	45.02889	-64.07973	Poplar Grove	0.093301	0.802692	0.012401	0.091607	East
414	FRANIGNS_942276	NS	45.02855	-64.07967	Poplar Grove	0.117137	0.741379	0.070906	0.070578	East
415	FRANIGNS_942278	NS	45.02905	-64.07877	Poplar Grove	0.125619	0.722679	0.041657	0.110044	East
416	FRANIGNS_942279	NS	45.02928	-64.07864	Poplar Grove	0.086693	0.748947	0.036213	0.128147	East
417	FRANIGNS_202210278	NS	45.0292525	-64.0784075	Poplar Grove	0.166971	0.756469	0.007859	0.068702	East
418	FRANIGNS_942280	NS	45.02943	-64.07836	Poplar Grove	0.184053	0.64341	0.034566	0.137971	East
419	FRANIGNS_942281	NS	45.02961	-64.0783	Poplar Grove	0.226417	0.663136	0.058333	0.052113	East
420	FRANIGNS_942282	NS	45.02961	-64.07802	Poplar Grove	0.132983	0.731935	0.04579	0.089292	East
421	FRANIGNS_942283	NS	45.02986	-64.07761	Poplar Grove	0.304619	0.514724	0.060887	0.11977	East
422	FRANIGNS_942284	NS	45.02997	-64.07732	Poplar Grove	0.203719	0.626483	0.063286	0.106513	East
423	FRANIGNS_942285	NS	45.02881	-64.07509	Poplar Grove	0.284577	0.626962	0.027513	0.060947	East
424	FRANIGNS_942286	NS	45.02856	-64.07502	Poplar Grove	0.193581	0.733452	0.053711	0.019255	East
425	FRANIGNS_942287	NS	45.02845	-64.07499	Poplar Grove	0.066898	0.814671	0.06678	0.051651	East
426	FRANIGNS_942288	NS	45.02871	-64.07471	Poplar Grove	0.136265	0.751528	0.049329	0.062877	East
427	FRANIGNS_942289	NS	45.02875	-64.07439	Poplar Grove	0.083162	0.849025	0.007843	0.05997	East
428	FRANIGPE_942397	PE	46.6143	-64.04045	North Enmore	0.13898	0.730646	0.072738	0.057636	East
429	FRANIGPE_942398	PE	46.61436	-64.04033	North Enmore	0.155918	0.704364	0.01257	0.127148	East
430	FRANIGPE_942395	PE	46.61061	-64.03938	North Enmore	0.172229	0.681757	0.051512	0.094502	East
431	FRANIGPE_942391	PE	46.61548	-64.03915	North Enmore	0.312251	0.540414	0.018895	0.12844	East
432	FRANIGPE_942390	PE	46.61516	-64.03908	North Enmore	0.122676	0.736681	0.026886	0.113757	East
433	FRANIGPE_942393	PE	46.61623	-64.0387	North Enmore	0.100376	0.700796	0.059342	0.139486	East

434	FRANIGPE_942400	PE	46.61631	-64.03849	North Enmore	0.145297	0.690444	0.054289	0.10997	East
435	FRANIGNS_202210286	NS	44.9854761	-64.0059247	Brooklyn	0.181623	0.611492	0.109491	0.097394	East
436	FRANIGNS_942377	NS	45.7149	-63.8776	Oxford	0.22254	0.665829	0.007407	0.104224	East
437	FRANIGNS_942376	NS	45.71387	-63.87737	Oxford	0.195428	0.706224	0.022507	0.07584	East
438	FRANIGNS_942375	NS	45.71388	-63.87692	Oxford	0.231911	0.707077	0.058363	0.002648	East
439	FRANIGNS_942378	NS	45.71285	-63.87637	Oxford	0.212963	0.707959	0.03761	0.041468	East
440	FRANIGNS_942384	NS	45.70917	-63.87277	Oxford	0.148482	0.747095	0.040186	0.064236	East
441	FRANIGNS_942385	NS	45.70928	-63.87245	Oxford	0.230227	0.616089	0.006446	0.147238	East
442	FRANIGNS_942383	NS	45.70945	-63.87228	Oxford	0.221001	0.661868	0.042073	0.075058	East
443	FRANIGNS_942387	NS	45.70972	-63.87218	Oxford	0.221292	0.64845	0.00001	0.130249	East
444	FRANIGNS_942310	NS	45.78322	-63.6502	Docherty's Brook	0.253081	0.665856	0.036739	0.044323	East
445	FRANIGNS_942309	NS	45.78333	-63.64995	Docherty's Brook	0.04688	0.859607	0.036006	0.057508	East
446	FRANIGNS_942311	NS	45.78305	-63.64918	Docherty's Brook	0.06735	0.764783	0.049896	0.117972	East
447	FRANIGNS_942307	NS	45.78333	-63.64898	Docherty's Brook	0.00001	0.968878	0.00001	0.031102	East
448	FRANIGNS_942306	NS	45.78321	-63.64879	Docherty's Brook	0.165055	0.757559	0.057349	0.020038	East
449	FRANIGNS_942312	NS	45.78272	-63.64878	Docherty's Brook	0.00001	0.97212	0.019557	0.008313	East
450	FRANIGNS_942313	NS	45.7826	-63.64845	Docherty's Brook	0.061664	0.845763	0.070299	0.022274	East
451	FRANIGNS_942305	NS	45.78323	-63.64837	Docherty's Brook	0.236263	0.616867	0.043108	0.103762	East
452	FRANIGNS_942314	NS	45.78275	-63.6479	Docherty's Brook	0.00001	0.866775	0.051525	0.081691	East
453	FRANIGNS_942330	NS	45.00879	-63.17997	South Section	0.196518	0.700215	0.05155	0.051716	East
454	FRANIGNS_942327	NS	45.00875	-63.17841	South Section	0.057634	0.856479	0.034755	0.051132	East
455	FRANIGNS_942326	NS	45.00821	-63.17739	South Section	0.241324	0.704716	0.025561	0.028398	East
456	FRANIGNS_942339	NS	45.00632	-63.17635	South Section	0.312151	0.617601	0.026809	0.043438	East
457	FRANIGNS_942336	NS	45.00609	-63.17554	South Section	0.174689	0.711323	0.010445	0.103544	East
458	FRANIGNS_942331	NS	45.00666	-63.17464	South Section	0.253312	0.681278	0.026622	0.038787	East
459	FRANIGNS_942332	NS	45.0063	-63.17456	South Section	0.216624	0.686669	0.043568	0.053139	East
460	FRANIGNS_202210288	NS	45.6078474	-61.9237863	Lanark	0.223515	0.740986	0.027553	0.007946	East
461	FRANIGNS_202210287	NS	45.6678647	-61.923666	Lanark	0.224177	0.646484	0.026431	0.102907	East
462	FRANIGNS_942322	NS	46.15378	-61.29628	Black River Bog	0.172098	0.729407	0.043204	0.055291	East
463	FRANIGNS_942324	NS	46.15254	-61.29606	Black River Bog	0.196683	0.677097	0.058557	0.067663	East
464	FRANIGNS_942318	NS	46.15276	-61.29593	Black River Bog	0.172462	0.683214	0.045371	0.098952	East

465	FRANIGNS_942323	NS	46.15289	-61.2959	Black River Bog	0.047889	0.834879	0.00205	0.115182	East
466	FRANIGNS_942321	NS	46.15344	-61.29585	Black River Bog	0.00001	0.785153	0.102086	0.112751	East
467	FRANIGNS_942317	NS	46.15286	-61.2957	Black River Bog	0.00001	0.864761	0.0144	0.120829	East
468	FRANIGNS_942319	NS	46.1531	-61.29563	Black River Bog	0.021494	0.794823	0.081271	0.102412	East
469	FRANIGNS_942320	NS	46.15318	-61.29546	Black River Bog	0.00001	0.812837	0.060276	0.126877	East
470	FRANIGNS_942316	NS	46.15287	-61.29543	Black River Bog	0.037454	0.823601	0.03369	0.105255	East
471	FRANIGNS_942315	NS	46.15266	-61.2954	Black River Bog	0.008096	0.836288	0.03912	0.116496	East

BIBLIOGRAPHIE

- Agence canadienne d'inspection des aliments. (2024, 5 septembre). *Zones et produits réglementés : Agrile du frêne*. <https://inspection.canada.ca/fr/protection-vegetaux/especes-envahissantes/directives/produits-forestiers/03-08/zones-reglementees#wb-auto-11>
- Ahvenainen, P. (2019). *Anatomy and mechanical properties of woods used in electric guitars*. <https://doi.org/10.1163/22941932-40190218>
- Alexander, D. H., Novembre, J. et Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19(9), 1655-1664. <https://doi.org/10.1101/gr.094052.109>
- Allendorf, F. W., Funk, W. C., Aitken, S. N., Byrne, M., Luikart, G. et Antunes, A. (2022). *Conservation and the Genomics of Populations (3rd edn)*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198856566.001.0001>
- Avice, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36(1), 3-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x>
- Barrett, R. D. H. et Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.008>
- Benedict, L. et David, R. (2003). Propagation protocol for black ash (*Fraxinus nigra* Marsh). *Native Plants Journal (Indiana University Press)*, 4(2), 100-103. <https://doi.org/10.3368/npj.4.2.100>
- Benedict, M. A. et Frelich, L. E. (2008). Site factors affecting black ash ring growth in northern Minnesota. *Forest Ecology and Management*, 255(8), 3489-3493. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.02.029>
- Bierne, N., Roze, D. et Welch, J. J. (2013). Pervasive selection or is it...? why are FST outliers sometimes so frequent? *Molecular Ecology*, 22(8), 2061-2064. <https://doi.org/10.1111/mec.12241>
- Blaney, S., Churchill, J., DeSantis, R. et Gormanson, D. Climatic Limitation of Emerald Ash Borer (*Agrilus planipennis*) Impacts on Black Ash (*Fraxinus nigra* Marsh) in Canada. Atlantic Canada Conservation Data Center. 31 mars 2018.
- Bonin, A. (2008). Population genomics: a new generation of genome scans to bridge the gap with functional genomics. *Molecular Ecology*, 17(16), 3583-3584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03854.x>
- Bonner, F. T. (2008). *Fraxinus* L. ash. Dans *The Woody Plant Seed Manual* (U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook, vol. 727, p. 537-543). <https://www.fs.usda.gov/research/treesearch/32626>
- Botanical Gardens Conservation International. (2021, septembre). *State of the World's Trees*. <https://oneplanetschool.wwf.it/publicazioni/state-worlds-trees-2021-bgci>

- Boudreault, L., Chagnon, C., Gauthier-Nolett, L., Durand-Nolett, M., Gill, D., Flamand-Hubert, M. et Achim, A. (2024). Physical and mechanical properties affecting the suitability of black ash wood for W8banaki basketry. *Canadian Journal of Forest Research*. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2023-0297>
- Brasier, C. M. (2008). The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology*, 57(5), 792-808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01886.x>
- Brockerhoff, E. G. et Liebhold, A. M. (2017). Ecology of forest insect invasions. *Biological Invasions*, 19(11), 3141-3159. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1514-1>
- Capblancq, T., Fitzpatrick, M. C., Bay, R. A., Exposito-Alonso, M. et Keller, S. R. (2020). Genomic Prediction of (Mal)Adaptation Across Current and Future Climatic Landscapes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51(1), 245-269. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-020720-042553>
- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A. et Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 3124-3140. <https://doi.org/10.1111/mec.12354>
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M. et Palmer, T. M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, 1(5), e1400253. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253>
- COSEPAC. Évaluation et Rapport de situation du COSEPAC sur Frêne noir (*Fraxinus nigra*) au Canada 2018. <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/registre-public-especes-peril/evaluations-rapports-situations-cosepac/frene-noir-2018.html> 2019.
- COSEWIC. Black Ash (*Fraxinus nigra*): COSEWIC assessment and status report 2018. <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/species-risk-public-registry/cosewic-assessments-status-reports/black-ash-2018.html> 28 août 2019.
- Costanza, K. K. L., Livingston, W. H., Kashian, D. M., Slesak, R. A., Tardif, J. C., Dech, J. P., Diamond, A. K., Daigle, J. J., Ranco, D. J., Neptune, J. S., Benedict, L., Fraver, S. R., Reinikainen, M. et Siegert, N. W. (2017). The Precarious State of a Cultural Keystone Species: Tribal and Biological Assessments of the Role and Future of Black Ash. *Journal of Forestry*, 115(5), 435-446. <https://doi.org/10.5849/jof.2016-034R1>
- Curtis, J. T. (1959). Black ash (*Fraxinus nigra*). Dans *The Vegetation of Wisconsin: An Ordination of Plant Communities* (p. 230-231). University of Wisconsin Pres.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A. et Davies, R. M. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2), giab008.
- Davidson, C. G. (1999). « Northern Treasure » and « Northern Gem » Hybrid Ash, (34(1):151-152).
- de Lafontaine, G., Napier, J. D., Petit, R. J. et Hu, F. S. (2018). Invoking adaptation to decipher the genetic legacy of past climate change. *Ecology*, 99(7), 1530-1546. <https://doi.org/10.1002/ecy.2382>

- Delcourt, P. A. et Delcourt, H. R. (1987). Long-Term Forest Dynamics of the Temperate Zone. Dans P. A. Delcourt et H. R. Delcourt (dir.), *Long-Term Forest Dynamics of the Temperate Zone: A Case Study of Late-Quaternary Forests in Eastern North America* (p. 374-398). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4740-1_10
- Di Santo, L. N. et Hamilton, J. A. (2021). Using environmental and geographic data to optimize ex situ collections and preserve evolutionary potential. *Conservation Biology*, 35(2), 733-744.
<https://doi.org/10.1111/cobi.13568>
- Duan, J. J., Gould, J. R., Quinn, N. F., Petrice, T. R., Slager, B. H., Poland, T. M., Bauer, L. S., Rutledge, C. E., Elkinton, J. S. et Van Driesche, R. G. (2023). Protection of North American ash against emerald ash borer with biological control: ecological premises and progress toward success. *BioControl*, 68(2), 87-100. <https://doi.org/10.1007/s10526-023-10182-w>
- Duan, J. J., Johnson, T. D., O’Dea, J. K., Petrice, T. R. et Haack, R. A. (2024). The Ecology, Economics, and Management of Agrilus Beetles. *Current Forestry Reports*, 10(6), 487-509.
<https://doi.org/10.1007/s40725-024-00230-8>
- Duan, J. J., Van Driesche, R. G., Schmude, J., Crandall, R., Rutledge, C., Quinn, N., Slager, B. H., Gould, J. R. et Elkinton, J. S. (2022). Significant suppression of invasive emerald ash borer by introduced parasitoids: potential for North American ash recovery. *Journal of Pest Science*, 95(3), 1081-1090.
<https://doi.org/10.1007/s10340-021-01441-9>
- Duell, M. E., Gray, M. T., Roe, A. D., MacQuarrie, C. J. K. et Sinclair, B. J. (2022). Plasticity drives extreme cold tolerance of emerald ash borer (*Agrilus planipennis*) during a polar vortex. *Current Research in Insect Science*, 2, 100031. <https://doi.org/10.1016/j.cris.2022.100031>
- Ehrenfeld, J. (2012). Northern Red Maple and Black Ash Swamps. Dans *Wetland Habitats of North America: Ecology and Conservation Concerns* (p. 149-160).
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S. et Mitchell, S. E. (2011). A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLOS ONE*, 6(5), e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- Emerald Ash Borer Network. (2024). *Emerald Ash Borer Network*.
<http://www.emeraldashborer.info/state-detection-table?perPage=9999>
- Erdmann, G. G., Crow, T. R., Peterson, R. M. J. et Wilson, C. D. (1987). Managing black ash in the Lake States. *General Technical Report NC-115*. St. Paul, MN: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station, 115. <https://doi.org/10.2737/NC-GTR-115>
- Exposito-Alonso, M. (2023). Understanding local plant extinctions before it is too late: bridging evolutionary genomics with global ecology. *New Phytologist*, 237(6), 2005-2011.
<https://doi.org/10.1111/nph.18718>
- Forester, B. R., Lasky, J. R., Wagner, H. H. et Urban, D. L. (2018). Comparing methods for detecting multilocus adaptation with multivariate genotype–environment associations. *Molecular Ecology*, 27(9), 2215-2233. <https://doi.org/10.1111/mec.14584>

- Frey, G., Emery, M. R. et Greenlaw, S. (2019). Weaving Together Livelihood and Culture in Maine, USA. Dans *Poverty Reduction Through Non-Timber Forest Products: Personal Stories* (p. 147-150). Springer Nature Switzerland AG. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-75580-9>
- Funk, W. C., McKay, J. K., Hohenlohe, P. A. et Allendorf, F. W. (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(9), 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.012>
- Gandhi, K. J. K. et Herms, D. A. (2010). North American arthropods at risk due to widespread *Fraxinus* mortality caused by the Alien Emerald ash borer. *Biological Invasions*, 12(6), 1839-1846. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9594-1>
- Go Botany. (2025). *Fraxinus excelsior* (European ash). <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/fraxinus/excelsior/>
- Godbout, J., Gros-Louis, M.-C., Lamothe, M. et Isabel, N. (2020). Going with the flow: Intraspecific variation may act as a natural ally to counterbalance the impacts of global change for the riparian species *Populus deltoides*. *Evolutionary Applications*, 13(1), 176-194. <https://doi.org/10.1111/eva.12854>
- Goessen, R., Isabel, N., Wehenkel, C., Pavy, N., Tischenko, L., Touchette, L., Giguère, I., Gros-Louis, M.-C., Laroche, J., Boyle, B., Soolanayakanahally, R., Mock, K., Hernández-Velasco, J., Simental-Rodriguez, S. L., Bousquet, J. et Porth, I. M. (2022). Coping with environmental constraints: Geographically divergent adaptive evolution and germination plasticity in the transcontinental *Populus tremuloides*. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 4(6), 638-654. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10297>
- Goudet, J. (2005). hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 184-186. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x>
- Gougherty, A. V., Chhatre, V. E., Keller, S. R. et Fitzpatrick, M. C. (2020a). Contemporary range position predicts the range-wide pattern of genetic diversity in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). *Journal of Biogeography*, 47(6), 1246-1257. <https://doi.org/10.1111/jbi.13811>
- Gougherty, A. V., Keller, S. R., Chhatre, V. E. et Fitzpatrick, M. C. (2020b, 28 février). *Future climate change promotes novel gene-climate associations in balsam poplar (Populus balsamifera L.), a forest tree species*, 2020.02.28.961060. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.02.28.961060>
- Gouvernement du Canada. (2024, 6 septembre). *Registre public des espèces en péril*. <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/registre-public-especes-peril.html>
- Grinde, A. R., Youngquist, M. B., Slesak, R. A., Kolbe, S. R., Bednar, J. D., Palik, B. J. et D'Amato, A. W. (2022). Potential impacts of emerald ash borer and adaptation strategies on wildlife communities in black ash wetlands. *Ecological Applications*, 32(4), e2567. <https://doi.org/10.1002/eap.2567>

- Gruber, B., Unmack, P. J., Berry, O. F. et Georges, A. (2018). dartr: An r package to facilitate analysis of SNP data generated from reduced representation genome sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 18(3), 691-699. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12745>
- Grummer, J. A., Beheregaray, L. B., Bernatchez, L., Hand, B. K., Luikart, G., Narum, S. R. et Taylor, E. B. (2019). Aquatic Landscape Genomics and Environmental Effects on Genetic Variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(7), 641-654. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.02.013>
- Gucker, C. L. (2005). *Fraxinus nigra*. In: *Fire Effects Information System*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service. <https://www.fs.usda.gov/database/feis/plants/tree/franig/all.html>
- Hämäläinen, A., Runnel, K., Mikusiński, G., Himmelbrant, D., Fenton, N. J. et Löhmus, P. (2023). Living Trees and Biodiversity. Dans M. M. Girona, H. Morin, S. Gauthier et Y. Bergeron (dir.), *Boreal Forests in the Face of Climate Change* (vol. 74, p. 145-166). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-15988-6_5
- Heinselman, M. L. (1981). Fire and Succession in the Conifer Forests of Northern North America. Dans D. C. West, H. H. Shugart et D. B. Botkin (dir.), *Forest Succession* (p. 374-405). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5950-3_23
- Herms, D. A. et McCullough, D. G. (2014). Emerald Ash Borer Invasion of North America: History, Biology, Ecology, Impacts, and Management. *Annual Review of Entomology*, 59(1), 13-30. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162051>
- Herrick, J. W. (1995). *Iroquois Medical Botany*. Syracuse University Press.
- Heuertz, M., Teufel, J., González-Martínez, S. C., Soto, A., Fady, B., Alía, R. et Vendramin, G. G. (2010). Geography determines genetic relationships between species of mountain pine (*Pinus mugo* complex) in western Europe. *Journal of Biogeography*, 37(3), 541-556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02223.x>
- Hinsinger, D. D., Basak, J., Gaudeul, M., Cruaud, C., Bertolino, P., Frascaria-Lacoste, N. et Bousquet, J. (2013). The Phylogeny and Biogeographic History of Ashes (*Fraxinus*, *Oleaceae*) Highlight the Roles of Migration and Vicariance in the Diversification of Temperate Trees. *PLoS ONE*, 8(11), e80431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080431>
- Hoban, S., Bruford, M., Jackson, J. D., Lopes-Fernandes, M., Heuertz, M., Hohenlohe, P. A., Paz-Vinas, I., Sjögren-Gulve, P., Segelbacher, G. et Vernesi, C. (2020). Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biological Conservation*, 248, 108654.
- Hoban, S., Kelley, J. L., Lotterhos, K. E., Antolin, M. F., Bradburd, G., Lowry, D. B., Poss, M. L., Reed, L. K., Storfer, A. et Whitlock, M. C. (2016). Finding the Genomic Basis of Local Adaptation: Pitfalls, Practical Solutions, and Future Directions. *The American Naturalist*, 188(4), 379-397. <https://doi.org/10.1086/688018>
- Hoffman, W. J. (1891). *The Midewiwin or « Grand Medicine Society » of the Ojibwa*. SI-BAE Annual Report #7. <https://www.gutenberg.org/ebooks/19368/pg19368-images.html>

- Holderegger, R., Kamm, U. et Gugerli, F. (2006). Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21(6), 797-807. <https://doi.org/10.1007/s10980-005-5245-9>
- Holsinger, K. E. et Weir, B. S. (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *F_{ST}*. *Nature Reviews Genetics*, 10(9), 639-650. <https://doi.org/10.1038/nrg2611>
- Huff, M., Seaman, J., Wu, D., Zhebentyayeva, T., Kelly, L. J., Faridi, N., Nelson, C. D., Cooper, E., Best, T., Steiner, K., Koch, J., Romero Severson, J., Carlson, J. E., Buggs, R. et Staton, M. (2022). A high-quality reference genome for *Fraxinus pennsylvanica* for ash species restoration and research. *Molecular Ecology Resources*, 22(4), 1284-1302. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13545>
- International Union for Conservation of Nature. (2024, 28 octobre). *More than one in three tree species worldwide faces extinction - IUCN Red List*. IUCN. <https://iucn.org/press-release/202410/more-one-three-tree-species-worldwide-faces-extinction-iucn-red-list>
- Iverson, L., Knight, K. S., Prasad, A., Herms, D. A., Matthews, S., Peters, M., Smith, A., Hartzler, D. M., Long, R. et Almendinger, J. (2016). Potential Species Replacements for Black Ash (*Fraxinus nigra*) at the Confluence of Two Threats: Emerald Ash Borer and a Changing Climate. *Ecosystems*, 19(2), 248-270. <https://doi.org/10.1007/s10021-015-9929-y>
- Jaramillo-Correa, J. P., Beaulieu, J., Khasa, D. P. et Bousquet, J. (2009). Inferring the past from the present phylogeographic structure of North American forest trees: seeing the forest for the genes. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(2), 286-307. <https://doi.org/10.1139/X08-181>
- Jerome, D., Westwood, M., Oldfield, S. et Romero-Severson, J. (2017). IUCN Red List of Threatened Species: *Fraxinus nigra*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2017*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T61918683A61918721.en>
- Keller, S. R., Olson, M. S., Silim, S., Schroeder, W. et Tiffin, P. (2010). Genomic diversity, population structure, and migration following rapid range expansion in the Balsam Poplar, *Populus balsamifera*. *Molecular Ecology*, 19(6), 1212-1226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04546.x>
- Kelly, L. J., Plumb, W. J., Carey, D. W., Mason, M. E., Cooper, E. D., Crowther, W., Whittemore, A. T., Rossiter, S. J., Koch, J. L. et Buggs, R. J. A. (2020). Convergent molecular evolution among ash species resistant to the emerald ash borer. *Nature Ecology & Evolution*, 4(8), 1116-1128. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1209-3>
- Kirtley, P. (2013, 24 novembre). *Know Your Ash From Your Elbow: How To Identify An Ash Tree*. Paul Kirtley. <https://paulkirtley.co.uk/2013/how-to-identify-an-ash-tree/>
- Kitamura, K. et Kawano, S. (2001). Regional Differentiation in Genetic Components for the American Beech, *Fagus grandifolia* Ehrh., in Relation to Geological History and Mode of Reproduction. *Journal of Plant Research*, 114(3), 353-368. <https://doi.org/10.1007/PL00013997>

- Klooster, W. S., Gandhi, K. J. K., Long, L. C., Perry, K. I., Rice, K. B. et Herms, D. A. (2018). Ecological Impacts of Emerald Ash Borer in Forests at the Epicenter of the Invasion in North America. *Forests*, 9(5), 250. <https://doi.org/10.3390/f9050250>
- Knight, K. S., Long, R. P., Rebbeck, J., Smith, A., Gandhi, K. et Herms, D. A. (2008). How fast will trees die? A transition matrix model of ash decline in forest stands infested by emerald ash borer. In: *Mastro, Victor; Lance, David; Reardon, Richard; Parra, Gregory, comps. Emerald ash borer research and development meeting; 2007 October 23-24; Pittsburgh, PA. FHTET 2008-07. Morgantown, WV: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team: 28-29.* <https://www.fs.usda.gov/research/treesearch/15194>
- Knoot, T. G., Shea, M. E., Schulte, L. A., Tyndall, J. C., Nelson, M. D., Perry, C. H. et Palik, B. J. (2015). Forest change in the Driftless Area of the Midwest: From a preferred to undesirable future. *Forest Ecology and Management*, 341, 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.12.013>
- Koch, J. L., Carey, D. W., Knight, K. S., Poland, T., Herms, D. A. et Mason, M. E. (2012). Breeding strategies for the development of emerald ash borer-resistant North American ash. Dans *Proceedings of the 4th International Workshop on the genetics of host-parasite interactions in forestry: disease and insect resistance in forest trees* (p. 235-239). USDA Forest Service, Pacific Southwest Research Station Albany, California. https://www.academia.edu/download/82105143/psw_gtr240_235.pdf
- Koch, J., Mason, M. E., Carey, D., Knight, K., Poland, T., Petrice, T., Doran, A., Wolf, J. et Nupp, Gavin. (2024, 8 octobre). *Breeding for EAB-Resistance: Saving Brown Ash*. Future of Brown Ash Meeting, University of Maine, Orono, Maine. <https://umaine.edu/apcaw/event/future-of-brown-ash-meeting/>
- Konrade, L. A. (2017). *Evaluating range genetics in black cherry (Prunus serotina) and the genetic status of an enigmatic relative, Alabama cherry (Prunus alabamensis)* [Wichita State University]. <http://hdl.handle.net/10057/14475>
- Kovacs, K. F., Mercader, R. J., Haight, R. G., Siegert, N. W., McCullough, D. G. et Liebhold, A. M. (2011). The influence of satellite populations of emerald ash borer on projected economic costs in U.S. communities, 2010–2020. *Journal of Environmental Management*, 92(9), 2170-2181. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.03.043>
- Krzemien, S., Robertson, W. M., Engelken, P. J. et McCullough, D. G. (2024). Observations of reduced ET and persistent elevated water table beneath a riparian forest gap following emerald ash borer invasion and tree mortality. *Hydrological Processes*, 38(4), e15117. <https://doi.org/10.1002/hyp.15117>
- LeMay, G. (2024, 8 octobre). *Regional Tree Injection Strategies*. Future of Brown Ash Meeting, University of Maine, Orono, Maine. <https://umaine.edu/apcaw/event/future-of-brown-ash-meeting/>
- Li, P., Li, M., Shi, Y., Zhao, Y., Wan, Y., Fu, C. et Cameron, K. M. (2013). Phylogeography of North American herbaceous Smilax (Smilacaceae): Combined AFLP and cpDNA data support a northern refugium in the Driftless Area. *American Journal of Botany*, 100(4), 801-814. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200250>

- Lotterhos, K. E. et Whitlock, M. C. (2015). The relative power of genome scans to detect local adaptation depends on sampling design and statistical method. *Molecular Ecology*, 24(5), 1031-1046. <https://doi.org/10.1111/mec.13100>
- Luikart, G., England, P. R., Tallmon, D., Jordan, S. et Taberlet, P. (2003). The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, 4(12), 981-994. <https://doi.org/10.1038/nrg1226>
- Marshall, H. (1785). *Arbustrum Americanum: The American Grove, Or An Alphabetical Catalogue Of Forest Trees And Shrubs, Natives Of The American United States* (vol. 1785, p. 1-206). Printed by Joseph Cruikshank, in Market-Street, between Second and Third-Streets. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.68506>
- Mason, M. E., Koch, J. L., Carey, D., Knight, K., Poland, T., Petrice, T., Doran, A., Wolf, J. et Nupp, Gavin. (2024, 2 octobre). *Black Ash Research Update*. Northern Forest Genetics Association, Burlington, Vermont. <https://rngr.net/resources/webinars/nfga-10-24/black-ash-research-update>
- Maxwell, S. L., Fuller, R. A., Brooks, T. M. et Watson, J. E. M. (2016). Biodiversity: The ravages of guns, nets and bulldozers. *Nature*, 536(7615), 143-145. <https://doi.org/10.1038/536143a>
- McCullough, D. G. (2020). *Challenges, tactics and integrated management of emerald ash borer in North America*, *Forestry: An International Journal of Forest Research* 93:197-211.
- McCullough, D. G., Poland, T. M., Tluczek, A. R., Anulewicz, A., Wieferich, J. et Siegert, N. W. (2019). Emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) densities over a 6-yr period on untreated trees and trees treated with systemic insecticides at 1-, 2-, and 3-yr intervals in a central Michigan forest. *Journal of economic entomology*, 112(1), 201-212.
- McNeely, J. A., Miller, K., Mittermeier, R. A., Reid, W. V. et Werner, T. B. (1990). *Conserving the world's biological diversity*. IUCN. <https://portals.iucn.org/library/node/5888>
- Meirmans, P., Godbout, J., Lamothe, M., Thompson, S. et Isabel, N. (2017). History rather than hybridization determines population structure and adaptation in *Populus balsamifera*. *Journal of Evolutionary Biology*, 30. <https://doi.org/10.1111/jeb.13174>
- Melton, A. E., Faske, T. M., Snieszko, R. A., Thibault, T., Williams, W., Parchman, T. et Hamilton, J. A. (2025). Genomics-Driven Monitoring of *Fraxinus latifolia* (Oregon Ash) to Inform Conservation and EAB-Resistance Breeding. *Molecular Ecology*, e17640. <https://doi.org/10.1111/mec.17640>
- Miller, D. (2024). *[Photographie de l'agrile du frêne]*. *Forestry Images*. <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5449380>.
- Morris, T. D., Gould, J. R. et Fierke, M. K. (2023). Establishment and impacts of emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) parasitoids released at early- and post-invasion sites. *Journal of Economic Entomology*, 116(4), 1155-1164. <https://doi.org/10.1093/jee/toad111>
- Muirhead, J. R., Leung, B., van Overdijk, C., Kelly, D. W., Nandakumar, K., Marchant, K. R. et MacIsaac, H. J. (2006). Modelling local and long-distance dispersal of invasive emerald ash borer *Agrilus*

- planipennis* (Coleoptera) in North America. *Diversity and Distributions*, 12(1), 71-79.
<https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2006.00218.x>
- Myers, N. (1993). Biodiversity and the Precautionary Principle. *Ambio*, 22(2/3), 74-79.
- Namkoong, G. (1991). Maintaining Genetic Diversity in Breeding for Resistance in Forest Trees. *Annual Review of Phytopathology*, 29(1), 325-342.
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.001545>
- Natural Resources Canada. (2025, 11 janvier). *NTSC – Seed collection and conservation*. <https://natural-resources.canada.ca/science-data/science-research/research-centres/ntsc-seed-collection-conservation>
- Neale, D. B. et Kremer, A. (2011). Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 111-122. <https://doi.org/10.1038/nrg2931>
- Neptune, J., Neuman, L. et Selin, H. (2015). Basketry of the Wabanaki Indians. *Encyclopaedia of the History of Science, Technology, and Medicine in Non-Western Cultures*. Dordrecht, NL: Springer Science+ Business Media. <https://mainecamps.org/content/uploads/2023/03/Neuman-Basketry-of-the-Wabanaki-Indians.pdf>
- Neuman, L. K. (2010). Basketry as Economic Enterprise and Cultural Revitalization: The Case of the Wabanaki Tribes of Maine. *Wicazo Sa Review*, 25(2), 89-106.
- Nielsen, L. R., McKinney, L. V., Hietala, A. M. et Kjær, E. D. (2017). The susceptibility of Asian, European and North American *Fraxinus* species to the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* reflects their phylogenetic history. *European Journal of Forest Research*, 136(1), 59-73.
<https://doi.org/10.1007/s10342-016-1009-0>
- Novembre, J. (2014). Variations on a Common STRUCTURE: New Algorithms for a Valuable Model. *Genetics*, 197(3), 809-811. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.166264>
- Palik, B. J., Ostry, M. E., Venette, R. C. et Abdela, E. (2012). Tree regeneration in black ash (*Fraxinus nigra*) stands exhibiting crown dieback in Minnesota. *Forest Ecology and Management*, 269, 26-30.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.12.020>
- Parchman, T. L., Gompert, Z., Mudge, J., Schilkey, F. D., Benkman, C. W. et Buerkle, C. A. (2012). Genome-wide association genetics of an adaptive trait in lodgepole pine. *Molecular Ecology*, 21(12), 2991-3005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05513.x>
- Pembleton, L. W., Cogan, N. O. I. et Forster, J. W. (2013). St AMPP : an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), 946-952. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12129>
- Perrigo, A., Hoorn, C. et Antonelli, A. (2020). Why mountains matter for biodiversity. *Journal of Biogeography*, 47(2), 315-325. <https://doi.org/10.1111/jbi.13731>

- Pike, C. C., Koch, J. et Nelson, C. D. (2021). Breeding for Resistance to Tree Pests: Successes, Challenges, and a Guide to the Future. *Journal of Forestry*, 119(1), 96-105. <https://doi.org/10.1093/jofore/fvaa049>
- Popkin, G. (2020). Rising from the ashes. *Science*, 370(6518), 756-759. <https://doi.org/10.1126/science.370.6518.756>
- Potter, K. M., Jetton, R. M., Dvorak, W. S., Hipkins, V. D., Rhea, R. et Whittier, W. A. (2012). Widespread inbreeding and unexpected geographic patterns of genetic variation in eastern hemlock (*Tsuga canadensis*), an imperiled North American conifer. *Conservation Genetics*, 13(2), 475-498. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0301-2>
- PRISM. (2025). *30-Year Normal Precipitation*. Northwest Alliance for Computational Science & Engineering. Récupéré le 8 août 2025 de <https://prism.oregonstate.edu/normals/>
- Pritchard, J. K., Stephens, M. et 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>
- Puritz, J. B., Hollenbeck, C. M. et Gold, J. R. (2014). dDocent: a RADseq, variant-calling pipeline designed for population genomics of non-model organisms. *PeerJ*, 2, e431.
- Qu, Y., Ericson, P. G. P., Quan, Q., Song, G., Zhang, R., Gao, B. et Lei, F. (2014). Long-term isolation and stability explain high genetic diversity in the Eastern Himalaya. *Molecular Ecology*, 23(3), 705-720. <https://doi.org/10.1111/mec.12619>
- R Core Team. (2024). *R: A language and environment for statistical computing* (version 4.4.2). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Razgour, O., Forester, B., Taggart, J. B., Bekaert, M., Juste, J., Ibáñez, C., Puechmaille, S. J., Novella-Fernandez, R., Alberdi, A. et Manel, S. (2019). Considering adaptive genetic variation in climate change vulnerability assessment reduces species range loss projections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(21), 10418-10423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820663116>
- Rebek, E. J., Herms, D. A. et Smitley, D. R. (2008). Interspecific Variation in Resistance to Emerald Ash Borer (*Coleoptera: Buprestidae*) Among North American and Asian Ash (*Fraxinus spp.*). *Environmental Entomology*, 37(1), 242-246. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2008\)37\[242:IVIRTE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2008)37[242:IVIRTE]2.0.CO;2)
- Reilstab, C., Gugerli, F., Eckert, A. J., Hancock, A. M. et Holderegger, R. (2015). A practical guide to environmental association analysis in landscape genomics. *Molecular Ecology*, 24(17), 4348-4370. <https://doi.org/10.1111/mec.13322>
- Ressources naturelles Canada. (2025, 11 janvier). *CNSF – Récolte et conservation des semences*. Ressources naturelles Canada. <https://ressources-naturelles.canada.ca/science-et-donnees/centres-de-recherche-et-laboratoires/centre-recherche-forets/centre-foresterie-atlantique/cnsf-recolte-et-conservation-des-semences/cnsf-recolte-et-conservation-des-semences/23985>

- Robichaud, A. et Comtois, P. (2021). Numerical modelling of birch pollen dispersion in Canada. *Environmental Research*, 194, 110554. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110554>
- Ronikier, M. (2011). Biogeography of high-mountain plants in the Carpathians: An emerging phylogeographical perspective. *TAXON*, 60(2), 373-389. <https://doi.org/10.1002/tax.602008>
- Rosenthal, J. et Wildova, R. (2024, 8 octobre). *Monitoring and Managing Ash (MaMA): a program that enables lingering (resilient) ash detection*. Future of Brown Ash Meeting, University of Maine, Orono, Maine. <https://umaine.edu/apcaw/event/future-of-brown-ash-meeting/>
- Ross, R. (2021). Wood handbook: Wood as an engineering material. *FPL-GTR-282*, 282, 1.
- RStudio Team. (2024). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio. <http://www.rstudio.com/>
- Schumacher, E., Brown, A., Williams, M., Romero-Severson, J., Beardmore, T. et Hoban, S. (2022). Range shifts in butternut, a rare, endangered tree, in response to past climate and modern conditions. *Journal of Biogeography*, 49(5), 866-878. <https://doi.org/10.1111/jbi.14350>
- Service canadien des forêts. (2015, 4 août). *Arbres, insectes et maladies des forêts du Canada*. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr>
- Service canadien des forêts. 2015. [Image de feuille du frêne blanc]. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/26>.
- Service canadien des forêts. 2015. [Image de feuille du frêne noir]. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/27>.
- Service canadien des forêts. 2015. [Image de feuille du frêne rouge]. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/28>.
- Service canadien des forêts. 2015. [Image du fruit du frêne blanc]. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/26>.
- Service canadien des forêts. 2015. [Image du fruit du frêne noir]. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/27>.
- Service canadien des forêts. 2015. [Image du fruit du frêne rouge]. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/28>.
- Service canadien des forêts. 2015. [Image du rameau en hiver du frêne blanc]. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/26>.
- Service canadien des forêts. 2015. [Image du rameau en hiver du frêne noir]. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/27>.
- Service canadien des forêts. 2015. [Image du rameau en hiver du frêne rouge]. <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/28>.

- Showalter, D. N., Saville, R. J., Orton, E. S., Buggs, R. J. A., Bonello, P. et Brown, J. K. M. (2020). Resistance of European ash (*Fraxinus excelsior*) saplings to larval feeding by the emerald ash borer (*Agrilus planipennis*). *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 2(1), 41-46. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10077>
- Siegert, N. W., McCullough, D. G., Luther, T., Benedict, L., Crocker, S., Church, K. et Banks, J. (2023). Biological invasion threatens keystone species indelibly entwined with Indigenous cultures. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 21(7), 310-316. <https://doi.org/10.1002/fee.2654>
- Silliman, K. et Davenport, D. (2022). *RADseq*. MarineOmics. https://marineomics.github.io/RADseq.html#Batch_effects
- Simpson, J. D., Loo, J. A. et McPhee, D. A. Genetic Variation of Black Ash in Nova Scotia. Natural Resources Canada Canadian Forest Service – Atlantic Forestry Centre, Fredericton, NB and the Confederacy of Mainland Mi'kmaq, Millbrook, NS. 2008.
- Sims, R. A., Kershaw, H. M. et Wickware, G. M. (1990). Black ash. Dans *The autecology of major tree species in the north central* (p. 95-99). Forestry Canada, Ontario Region, Sault Ste. Marie, Ontario. COFRDA Report 3302. <http://cfs.nrcan.gc.ca/publications?id=22213>
- Singh, J. S. (2002). The biodiversity crisis: A multifaceted review. *Current Science*, 82(6), 638-647.
- Slesak, R. A., Lenhart, C. F., Brooks, K. N., D'Amato, A. W. et Palik, B. J. (2014). Water table response to harvesting and simulated emerald ash borer mortality in black ash wetlands in Minnesota, USA. *Canadian Journal of Forest Research*, 44(8), 961-968. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2014-0111>
- Snieszko, R. A. et Koch, J. (2017). Breeding trees resistant to insects and diseases: putting theory into application. *Biological Invasions*, 19(11), 3377-3400. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1482-5>
- Soltis, D. E., Morris, A. B., McLACHLAN, J. S., Manos, P. S. et Soltis, P. S. (2006). Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology*, 15(14), 4261-4293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03061.x>
- Steiner, K. C., Graboski, L. E., Knight, K. S., Koch, J. L. et Mason, M. E. (2019). Genetic, spatial, and temporal aspects of decline and mortality in a *Fraxinus* provenance test following invasion by the emerald ash borer. *Biological Invasions*, 21(11), 3439-3450. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02059-w>
- Storz, J. F. (2005). Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology*, 14(3), 671-688. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02437.x>
- Sutherland, E. K., Hale, B. J. et Hix, D. M. (2000). Defining species guilds in the Central Hardwood Forest, USA. *Plant Ecology*, 147(1), 1-20. <https://doi.org/10.1023/A:1009833805544>
- Tauber, H. (1965). Differential pollen dispersion and the interpretation of pollen diagrams. With a contribution to the interpretation of the elm fall. *Danmarks Geologiske Undersøgelse II. Række*, 89, 1-69. <https://doi.org/10.34194/raekke2.v89.6880>

- Thébaud, C. et Debussche, M. (1991). Rapid Invasion of *Fraxinus ornus* L. Along the Hérault River System in Southern France: The Importance of Seed Dispersal by Water. *Journal of Biogeography*, 18(1), 7-12. <https://doi.org/10.2307/2845240>
- Union internationale pour la conservation de la nature. Plus d'une espèce d'arbre sur trois dans le monde est menacée d'extinction - Liste rouge de l'UICN. UICN. <https://iucn.org/fr/communiquede-presse/202410/plus-dune-espece-darbre-sur-trois-dans-le-monde-est-menacee-dextinction> 28 octobre 2024.
- United States Department of Agriculture et Natural Resources Conservation Service. Black ash *Fraxinus nigra*. 2006.
- University of Wisconsin - Green Bay. (2024). *Fraxinus comparison chart*. https://www.uwgb.edu/biodiversity-old/herbarium/trees/Fraxinus_comparison01.htm
- U.S. Animal and Plant Health Inspection Service. (2024, 7 juin). *Emerald Ash Borer*. <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/plant-pest-and-disease-programs/pests-and-diseases/emerald-ash-borer>
- U.S. Forest Service. (2024). *Black ash (Fraxinus nigra)*. US Department of Agriculture. <https://www.fs.usda.gov/nrs/atlas/tree/v3/543>
- Vargas-Rodriguez, Y. L., Platt, W. J., Urbatsch, L. E. et Foltz, D. W. (2015). Large scale patterns of genetic variation and differentiation in sugar maple from tropical Central America to temperate North America. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0518-7>
- Volis, S. et Blecher, M. (2010). Quasi in situ: a bridge between ex situ and in situ conservation of plants. *Biodiversity and Conservation*, 19(9), 2441-2454. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9849-2>
- Wagner, D. L. et Todd, K. J. (2015). Ecological impacts of emerald ash borer. *Biology and control of emerald ash borer*, 15-63.
- Walter, R. et Epperson, B. K. (2005). Geographic pattern of genetic diversity in *Pinus resinosa*: contact zone between descendants of glacial refugia. *American Journal of Botany*, 92(1), 92-100. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.1.92>
- Williams, N. (1998). Study Finds 10% of Tree Species Under Threat. *Science*, 281(5382), 1426-1426. <https://doi.org/10.1126/science.281.5382.1426>
- Woodcock, P., Cottrell, J. E., Buggs, R. J. A. et Quine, C. P. (2018). Mitigating pest and pathogen impacts using resistant trees: a framework and overview to inform development and deployment in Europe and North America. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 91(1), 1-16. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpx031>
- Wright, J. W. (1953). Notes on flowering and fruiting of northeastern trees. *Station Paper NE-60. Upper Darby, PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station. 38 p., 60.* <https://www.fs.usda.gov/research/treesearch/13375>
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian Populations. *Genetics*, 16(2), 97-159.

Wright, S. (1951). The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, 15(1), 323-354.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>

Zinck, J. W. R. et Rajora, O. P. (2016). Post-glacial phylogeography and evolution of a wide-ranging highly-exploited keystone forest tree, eastern white pine (*Pinus strobus*) in North America: single refugium, multiple routes. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0624-1>