

VICKY ALBERT

**HYBRIDATION NATURELLE ENTRE LES
ANGUILLES AMÉRICAINES ET EUROPÉENNES**
Ampleur, répartition et stades de vie

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

SEPTEMBRE, 2005

© Vicky Albert, 2005

Résumé

Les conséquences de l'hybridation dans les processus évolutifs demeurent, en grande partie, inexplorées chez les animaux. Sachant qu'il y a hybridation entre les anguilles américaines (*Anguilla rostrata*) et européennes (*A. anguilla*), l'objectif de cette étude était de documenter la dynamique de l'hybridation afin de mieux comprendre son importance évolutive pour les deux espèces. Les génotypes AFLP de 1127 anguilles furent utilisés afin d'identifier les individus hybrides et évaluer la dynamique de l'hybridation. Les résultats démontrent que i) une proportion importante (15.5%) des anguilles islandaises sont hybrides, ii) les hybrides de première génération sont fertiles et se reproduisent, iii) en Islande, la proportion d'hybride est plus importante dans le stade de vie anguille jaune et iv) la distribution des hybrides est quasi-exclusive à l'Islande où leur proportion augmente avec la latitude. Ainsi, les résultats démontrent que l'hybridation peut influencer les processus évolutifs chez les animaux et qu'elle devrait être considérée plus formellement.

Abstract

Since only few studies have evaluated fitness beyond the first hybrid generation, the evolutionary processes as well as the potential outcome of natural hybridization remain largely unexplored in animals. Knowing that hybridization occurs between American and European eels (*Anguilla rostrata* and *A. anguilla*), this study aimed at documenting the dynamics of natural hybridization in order to better understand its potential evolutionary impact for the two species. AFLP genotypes of 1127 eels were used to identify hybrid individuals and evaluate dynamics of hybridization. Results provide evidence for i) an overall hybrid proportion of 15.5% in Iceland, ii) the occurrence of viable later generation hybrids, iii) a higher proportion of hybrids in the yellow eel samples, and iv) quasi-exclusive distribution of hybrids in Iceland where they tend to increase in proportion with latitude. This study thus demonstrates that natural hybridization can have an influence on evolutionary processes in animals and should be considered more formally.

Avant-Propos

Trois années se sont écoulées depuis le début de mon projet de maîtrise. Aujourd'hui, c'est avec une immense fierté et un bonheur intense que je vous présente l'accomplissement de ces années de travail à la fois fascinantes et exigeantes. Bien au-delà des acquis scientifiques, je ressors de cette expérience grandie sur le plan personnel, social et professionnel. L'effort et le temps consacrés à la réalisation de mes objectifs m'ont appris à repousser mes limites et à toujours persévérer. C'est avec plus de confiance, d'assurance et de détermination que je surmonterai les différentes étapes de ma vie future.

Malgré les efforts et la détermination, l'aboutissement de mon projet aurait été impossible sans la contribution et le support de plusieurs personnes que je tiens ici à remercier sincèrement.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Louis Bernatchez. La grande confiance qu'il m'a accordée m'a permis une grande marge de manœuvre rendant l'expérience encore plus formatrice. Malgré les embûches, il m'a permis de croire en mes capacités et m'a appris à persévérer. Louis est un chercheur extrêmement motivé et motivant qui donne le goût de relever de nouveaux défis. Merci pour ses commentaires pertinents, formateurs et pour son soutien constant. J'aimerais aussi le remercier sincèrement pour les expériences uniques, enrichissantes et inoubliables qu'il m'a permis de vivre en m'offrant de participer à des événements scientifiques internationaux.

Merci à un collaborateur indispensable, Bjarni Jónsson. Dès le départ, il nous a fait entièrement confiance. Son intérêt marqué pour les anguilles et leur écologie ainsi que ses connaissances intarissables sur l'écologie des poissons en Islande ont inspiré ma réflexion. En plus de pourvoir une grande partie des échantillons de mon projet, il m'a accueillie chaleureusement et généreusement à deux reprises. Grâce à Bjarni, j'ai pu découvrir l'Islande et sa richesse culturelle.

Il me serait impossible de passer sous silence l'importance de tous les membres du laboratoire. La dynamique d'entraide qui entoure le groupe rend les journées beaucoup plus agréables. Ce fut un réel plaisir de passer ces années en leur compagnie. Plus précisément, j'aimerais mentionner les conseils et la présence de Mélissa, Catherine, Guillaume, Lucie,

Robert, Émilie et Mélanie. Merci aussi à Sean, Dylan, Anne-Marie, David V., David C. et Pierre pour leur intérêt et leur support scientifique.

Je ne pourrai jamais remercier suffisamment ma famille pour leur support et leurs encouragements. Ils m'ont toujours poussé à me dépasser. Leur dévouement est remarquable et m'a amené à viser haut et loin. Merci à Maxime pour sa patience au cours des longues semaines de travail. Malgré les hauts et les bas dans mon projet, il a toujours été là. Sa compréhension m'a beaucoup encouragé et m'a aussi permis de garder mes priorités en place. Une mention spéciale à Marie-Hélène pour ses commentaires sur le mémoire. Finalement, merci à tous mes ami(e)s. Leur présence, leur joie de vivre et leur amitié ont rendu mes moments de divertissement intenses et inoubliables...

Merci à tous!

Au moment de faire mon dépôt initial, le chapitre 1 était soumis à la revue *Molecular Ecology*. Les coauteurs du chapitre 1 ont contribué à ma supervision (L.B.), ainsi qu'au travail considérable de terrain (B.J.). Le travail de laboratoire, les analyses et la rédaction furent réalisés par moi-même, bien entendu sous la supervision et les conseils de mon directeur et mon collaborateur. Au moment du dépôt final, le chapitre 1 était accepté pour publication dans la revue *Molecular Ecology*.

Enfin, ce travail n'aurait pu avoir lieu sans le support financier du Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT), du groupe interinstitutionnel de recherches océanographiques du Québec (Québec-Océan) et du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG).

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
AVANT-PROPOS	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	1
L'HYBRIDATION	2
HYBRIDATION EN MILIEU NATUREL	4
<i>Zones hybrides</i>	4
<i>Renforcement de l'isolement reproductif</i>	5
<i>Extinction génétique</i>	5
<i>Spéciation</i>	6
<i>Diversité génétique</i>	6
LES ANGUILLES	7
<i>Historique</i>	7
<i>Cycle biologique</i>	8
<i>Aire de reproduction</i>	9
<i>Débat sur le statut des anguilles américaines et européennes</i>	9
PROBLÉMATIQUE	10
OBJECTIFS	11
CHAPITRE 1 NATURAL HYBRIDS IN ATLANTIC EELS (<i>ANGUILLA ANGUILLA</i>, <i>A. ROSTRATA</i>): EVIDENCE FOR SUCCESSFUL REPRODUCTION AND FLUCTUATING ABUNDANCE IN SPACE AND TIME	13
RÉSUMÉ FRANÇAIS	14
INTRODUCTION	15
MATERIALS AND METHODS	18
<i>Samples</i>	18
<i>AFLP genotyping</i>	18
<i>Individual hybrid status</i>	19
<i>Hybrid proportion versus life stages and sampling sites</i>	20
RESULTS	22
<i>Individual hybrid status</i>	22
<i>Hybrid proportion versus life stages and sampling sites</i>	23
DISCUSSION	24
<i>Extent of hybridization and existence of hybrids beyond F₁ generation</i>	24
<i>Geographic distribution of hybrids</i>	26
<i>Hybrid proportion in Icelandic samples</i>	27
<i>Implications for natural hybridization studies</i>	31
CONCLUSION	40
BIBLIOGRAPHIE	44

Liste des tableaux

Table 1. Life stage, sampling year, and sample size (n) for each sampling site separately. Proportion of polymorphic loci, expected heterozygosity (H_j), and proportion of pure American (Am), F_1 , F_N , and pure European (Eu) for the American, European, and Icelandic samples as well as for each sampling site separately. G represents glass eels and Y, yellow eels. Dash signs (-) indicate no observations in the status category. Population abbreviations are defined in figure 1 legend.	33
Table 2. Proportions of pure, first (F_1), and later generation hybrids (F_N) in the glass eel and yellow eel samples collected in Vogslækur (VO), Stokkseyri (ST), Vífilsstadavatn (VI), and Seljar (SE).	34

Liste des figures

- Figure 1. Geographic distribution of eel sampling sites in Iceland (top panel), North America and Europe (bottom panel). Star symbols refer to locations where both glass eels and yellow eels were collected. Icelandic samples are: Öxnalækur (ÖX); Stokkseyri (ST); Grafarvogur (GR); Vífilsstadavatn (VI); Seljar (SE); Vogslækur (VO); Bár (BA); Reykhólar (RE); Vatnsdalur (VA); Sauðárkrókur (SA). North American eel locations: Medomak River (ME); Boston Harbor (BO); Wye River (WY); St-Johns River (SJ). European eel locations: Elbe River (EL); Grand Lieu Lake (GL); Minho River (MI); Moulouya oued (MO).....35
- Figure 2. Admixture proportions of North American, European, and Icelandic samples. Each individual is represented by a vertical bar; the proportion of black and white in each bar represents the proportion of the individual's genome from *Anguilla rostrata* (American) and *A. anguilla* (European) ancestry, respectively. The dotted horizontal line indicates the 0.5 admixture level. Null values refer to admixture proportions smaller than 0.001, while 1 refers to admixture values larger than 0.99936
- Figure 3. Proportions of pure *Anguilla rostrata* (closed bars), pure *A. anguilla* (open bars), first generation (dotted), and later generation hybrids (striped) within each sampling sites for continental Europe, Iceland, and North America. Population abbreviations are defined in figure 1 legend37
- Figure 4. Relationship between the proportion of F_1 (A), F_N (B), or F_1 and F_N combined (C) with time period (defined in Materials and Methods section). Chi-square (χ^2) and p-values are presented. Solid diamonds refer to yellow eel samples and opened diamonds to the glass eel samples.38
- Figure 5. Pearson correlation (R^2) between the proportion of hybrids and latitude (first and later generation hybrids combined) in Icelandic samples.....39

Introduction

Historique

La diversité du vivant intrigue les scientifiques depuis bien longtemps. Jean-Baptiste de Lamarck (1744-1829) amena le premier modèle global tentant d'expliquer les mécanismes de l'évolution biologique : le transformisme. Selon la théorie de Lamarck, il y aurait formation spontanée et continue d'organismes microscopiques qui évolueraient continuellement vers une complexité grandissante dans le but d'atteindre la perfection. Deux idées principales ressortaient de sa thèse. Tout d'abord, que les organes les plus utilisés par un organisme pour sa survie se développent au cours de sa vie, alors que les moins utilisés s'atrophient. Ensuite, que les caractères acquis sont héréditaires. Bien qu'audacieux et révolutionnaire, le transformisme de Lamarck fut remplacé avec les années par une théorie de l'évolution aujourd'hui majoritairement acceptée dans le milieu scientifique. Cette théorie fut apportée en 1859 par Charles Darwin (1809-1882) (Ridley 1997). Selon Darwin, les ressources du milieu sont limitées ce qui implique que seule une fraction des descendants survit à chaque génération. En fait, les individus d'une population diffèrent les uns des autres et ce sont les mieux adaptés qui, par sélection naturelle, survivent mieux et produisent le plus de descendants. Cette survie différentielle amène donc une modification graduelle de la population au sein de laquelle les caractères favorables s'accumulent avec le temps.

À l'époque de Darwin, la sélection naturelle ne faisait pas l'unanimité puisqu'on s'expliquait mal le fait que les descendants ressemblent à leurs parents sans toutefois leur être identiques. Ce n'est qu'au début des années 1940 que fut présentée une théorie globale de l'évolution faisant le lien entre la théorie de Darwin et les lois de l'hérédité du botaniste Gregor Mendel (1822-1884). La théorie synthétique de l'évolution, ou néodarwinisme, venait de naître. Cette théorie fut élaborée grâce aux apports de généticiens tels que G. Ledyard Stebbins et Theodosius Dobzhansky, de zoologistes tels que Ernst Mayr et Julian Huxley, de paléontologues tels que Georges Gaylord Simpson et Glenn L. Jepsen et aux apports de généticiens mathématiciens tels que Ronald Fisher et Sewall Wright. Ainsi, la théorie synthétique réaffirmait le concept de sélection naturelle tel qu'il avait été donné par

Darwin et regroupait la sélection naturelle avec les nouvelles données de la génétique mendélienne. Aujourd'hui, un débat existe encore quant au rôle et à l'importance de la sélection naturelle aux différents niveaux taxonomiques (microévolution versus macroévolution). Néanmoins, les biologistes de l'évolution s'entendent pour dire que quatre principales forces évolutives agissent au niveau des populations et des espèces : la sélection naturelle, la dérive génétique, les mutations et le flux génétique.

L'hybridation

Le flux génétique, généralement défini comme l'échange de gamètes entre populations d'une même espèce, n'est point contesté en tant que force évolutive. Cependant, lorsqu'il y a un échange de gamètes à un niveau taxonomique supérieur, on parle alors d'hybridation et les conséquences évolutives sont beaucoup plus controversées. En fait, jusqu'à tout récemment, la plupart des auteurs considéraient que les hybrides naturels entre espèces animales étaient au pire inexistants et au mieux des individus mal adaptés n'ayant peu ou pas de rôle à jouer dans l'évolution du vivant (Arnold 1997).

Les botanistes furent les premiers à reconnaître que l'hybridation en milieu naturel peut jouer un rôle significatif dans l'évolution (revu dans Arnold 1997). Ainsi, le succès reproducteur des hybrides, la fixation de caractères hybrides, le rôle de l'habitat, la formation de nouvelles espèces par une augmentation du nombre de chromosomes homologues (polyploïdisation) et l'isolement des populations hybrides sont tous des éléments qui se succédèrent dans la discussion sur les conséquences potentielles de l'hybridation entre espèces végétales (revu dans Rieseberg 1997). Du côté des zoologistes, quelques précurseurs émirent l'hypothèse d'un potentiel effet diversifiant de l'hybridation, mais ces derniers furent longuement ignorés (Arnold 2004). Par exemple, en 1966, Lewontin et Birch proposèrent que l'hybridation entre espèces distinctes pourrait permettre le transfert d'adaptations telle que la tolérance aux extrêmes de température.

L'effet qu'aura l'hybridation en milieu naturel est grandement influencé par le succès reproducteur des individus hybrides par rapport aux individus purs avec lesquels ils coexistent. Le succès reproducteur est lui-même déterminé par les pressions de sélection endogènes (intrinsèques) et exogènes (extrinsèques). En fait, un succès reproducteur

supérieur des hybrides peut être observé si les hétérozygotes sont avantagés, un phénomène appelé hétérosis parfois observé dans les premières générations hybrides (Edmands 1999; Hotz *et al.* 1999). Un avantage des hybrides peut aussi résulter d'interactions épistatiques positives ou de la suppression des allèles récessifs délétères. À l'opposé, un succès reproducteur inférieur des hybrides peut résulter de l'épistasie négative menant, par exemple, en un dérèglement des systèmes de gènes co-adaptés (Burke & Arnold 2001). La variation des pressions de sélection dans le temps et dans l'espace fera varier par le fait même le succès reproducteur relatif des hybrides (p. ex. Grant & Grant 1996).

En plus de varier dans le temps et dans l'espace, le succès reproducteur relatif des hybrides peut aussi varier en fonction de la génération hybride (Arnold & Hodges 1995). En effet, un succès reproducteur supérieur peut être observé dans les premières générations hybrides suite à un effet d'hétérosis alors que les générations hybrides subséquentes peuvent démontrer une infériorité en raison de l'épistasie négative (Edmands 1999; Gharrett *et al.* 1999). Alors que la variation dans le succès reproducteur relatif des hybrides a déjà été observée (Arnold & Hodges 1995; Burke & Arnold 2001) et modélisée (Barton 2001), la supériorité des hybrides par rapport à au moins une des deux espèces parentales est de plus en plus documentée (revu dans Arnold 1997; Arnold *et al.* 1999). Des exemples où la première génération hybride (F_1) présente un succès reproducteur égal ou supérieur à au moins une des espèces parentales sont communes chez les plantes (p. ex. Burke *et al.* 1998; Campbell & Waser 2001; Campbell 2003; Kirk *et al.* 2005; Orians *et al.* 1999; Song *et al.* 2004) et des exemples existent aussi chez les animaux. Cependant, un nombre relativement faible d'études ont évalué le succès reproducteur au-delà de la première génération hybride et lorsqu'elles le faisaient, ces études ne considéraient pas chacune des générations séparément. Lorsque les études ont considéré les différentes générations, elles l'ont souvent fait en laboratoire ou en milieu contrôlé (p. ex. Burgess & Husband 2004; Campbell *et al.* 1998; Facon *et al.* 2005; Fritsche & Kaltz 2000; Gilk *et al.* 2004; Good *et al.* 2000; Hauser *et al.* 2003; Howard *et al.* 1993; Moore & Koenig 1986; Rosenfield *et al.* 2004; Saino & Villa 1992; Vilà & D'Antonio 1998; Wang *et al.* 1997). Ainsi, les conséquences évolutives de l'hybridation demeurent encore faiblement explorées chez les animaux et encore moins

en milieu naturel (Grant & Grant 1992; voir cependant Burke & Arnold 2001; Emms & Arnold 1997; Perry *et al.* 2001; Schweitzer *et al.* 2002).

Hybridation en milieu naturel

Les conséquences évolutives de l'hybridation en milieu naturel est un sujet qui a suscité de nombreux débats. Certains affirmaient que le succès reproducteur inférieur des hybrides pouvait tout au plus avoir un effet dans le renforcement de l'isolement reproductif des espèces (revu dans Barton & Hewitt 1985). À l'opposé, d'autres ont affirmé que l'hybridation pourrait accélérer l'évolution en générant des variations adaptatives, de nouveaux complexes fonctionnels de gènes et même de nouvelles espèces (Arnold 1997, 2004; Anderson & Stebbins 1954; Lewontin & Birch 1966; Seehausen 2004; Templeton 1981). Aujourd'hui, il est maintenant reconnu que l'hybridation en milieu naturel est un processus à long terme qui peut avoir plusieurs effets sur l'évolution et la biologie des espèces (Arnold 1997; Dowling & Secor 1997). Les sections qui suivent en présentent quelques exemples.

Zones hybrides

Lorsque deux populations ou espèces différant pour au moins un caractère héritable entrent en contact et se reproduisent, si la progéniture est viable et fertile, on parle de zone hybride (Arnold 1997). Les zones hybrides se divisent en deux catégories. Tout d'abord, il y a les modèles qui considèrent que le succès reproducteur des hybrides ne dépend pas de l'environnement. Dans cette catégorie, le modèle de zone hybride le plus connu est celui de la zone de tension (*Tension Zone*, Barton & Hewitt 1985). Selon ce dernier, ce sont les pressions de sélection endogènes (p. ex. incompatibilités génétiques, épistasie négative, etc.) qui font en sorte que le succès reproducteur des hybrides est toujours inférieur aux individus purs. Le maintien de la zone hybride est alors possible seulement lorsqu'il y a un équilibre entre le succès reproducteur inférieur des hybrides et l'arrivée d'individus purs dans la zone hybride (Barton & Hewitt 1985). Cependant, les patrons génétiques et écologiques observés dans les zones hybrides ne concordent pas toujours avec ce modèle de zone hybride. Souvent, les données indiquent que le succès reproducteur des hybrides est dépendant de l'environnement. Il y a donc une deuxième catégorie de zones hybrides qui

considère que le succès reproducteur des hybrides est dépendant de l'environnement. Dans cette catégorie, certains modèles considèrent que le succès reproducteur des hybrides est inférieur à celui des individus purs tel que le modèle de zone hybride en mosaïque (*Mosaic*, Harrison 1986; Howard 1986). D'autres considèrent que le succès reproducteur des hybrides peut être inférieur, égal ou supérieur en fonction de l'habitat dans lequel les hybrides se trouvent tels que le modèle de supériorité délimitée des hybrides (*Bounded Hybrid Superiority*, Moore 1977) et le modèle de nouveauté évolutive (*Evolutionary Novelty*, Arnold 1997).

Renforcement de l'isolement reproductif

Le renforcement est défini comme un mécanisme qui agit de façon à prévenir la reproduction entre individus d'espèces divergentes (à leur premier stade de divergence) et résulte d'une sélection contre les hybrides ou contre les croisements interspécifiques (Servedio 2004). En fait, la distance génétique entre deux populations ou espèces augmente avec le temps de séparation (Coyne & Orr 2004). Plus la distance génétique est grande, plus les incompatibilités entre les deux groupes seront importantes et plus les croisements hybrides seront désavantagés. Ainsi, les individus évitant les croisements hybrides seront favorisés et peu à peu les reproductions interspécifiques ne se produiront plus. Malgré la controverse concernant l'importance du renforcement de l'isolement reproductif en nature, des exemples de renforcement de l'isolement reproductif ont été présentés dans la littérature (Noor 1995; Nosil *et al.* 2003; Pfennig 2003; Rundle & Schluter 1998; Saetre *et al.* 1997).

Extinction génétique

Il y a extinction génétique lorsque l'intégrité génétique d'une espèce est modifiée suite à l'introgession de gènes provenant d'une autre espèce (Rhymer & Simberloff 1996). Plusieurs expressions ont été utilisées pour signifier ce processus : assimilation génétique, contamination, détérioration génétique, pollution génétique, etc. L'extinction génétique peut survenir dans différentes situations. Tout d'abord, il est possible qu'une espèce nouvellement introduite se reproduise avec une espèce déjà présente et qu'il y ait échange de gènes de sorte qu'il n'existe plus d'individus indigènes à l'état pur. Par exemple,

l'introduction répétitive de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) dans la rivière Kootenay (Colombie-Britannique, Canada) a mené à l'extinction génétique de certaines populations de truites fardées indigènes à cette rivière (*O. clarki lewisi*) (Rubidge & Taylor 2004). Par ailleurs, plus la ou les espèces impliquées sont rares, plus l'extinction génétique par hybridation pourra être importante.

Spéciation

L'hybridation en milieu naturel peut aussi avoir un effet créatif en menant à la formation de nouvelles espèces (revu dans Dowling & Secor 1997). Cette formation de nouvelles espèces peut se dérouler de deux façons principales. Tout d'abord, l'hybridation peut former une nouvelle espèce instantanément en produisant des individus avec un nombre ou un arrangement des chromosomes homologues différents de celui des parents, un phénomène nommé allopolyploïdie. L'hybridation peut aussi mener à la formation spontanée d'une nouvelle espèce en générant des lignées unisexuelles se reproduisant de façon asexuée. Souvent ces lignées sont composées uniquement de femelles et les trois modes de reproduction les plus fréquents sont la parthénogenèse, le gynogenèse et l'hybridogenèse.

Un deuxième mode de spéciation que peut enclencher l'hybridation est appelé spéciation homoploïde ou spéciation recombinante (Templeton 1981). Dans ce cas-ci, le nombre et l'arrangement des chromosomes restent le même. L'hybridation entre les espèces amène la formation de groupes d'individus recombinants. Il y a spéciation lorsque ces groupes d'individus recombinants se stabilisent et forment un taxon indépendant se reproduisant sexuellement. Salzburger et al. (2002) ont démontré que le scénario de spéciation recombinante était le plus probable pour expliquer les patrons génétiques observés chez une espèce de cichlidés du lac Tanganyika en Afrique (*Neolamprologus marunguensis*). Un autre exemple bien connu de spéciation recombinante est celui de l'espèce *Gila seminuda* (Teleostei : Cyprinidae) (Demarais et al. 1992).

Diversité génétique

L'hybridation peut amener une augmentation de la diversité de plusieurs façons à l'intérieur d'une espèce ou d'un groupe d'individus. Tout d'abord, l'hybridation peut mener à la

formation d'individus hybrides ayant des caractères phénotypiques extrêmes par rapport à ceux des individus purs, un phénomène appelé ségrégation transgressive (Rieseberg *et al.* 1999). En générant des caractères phénotypiques excédant ceux des souches parentales, la ségrégation transgressive peut permettre aux individus hybrides d'accéder à une niche écologique différente de celles des souches parentales, facilitant par le fait même la fixation des groupes recombinants. De même, l'hybridation peut changer la diversité génétique d'une espèce lorsqu'il y a transfert de matériel génétique d'une espèce vers l'autre par introgression. En 1966, Lewontin et Birch proposait déjà ce mécanisme pour expliquer les expansions de l'aire de répartition d'une espèce australienne de diptère (*Bactrocera tryoni*) vers des habitats où la température était normalement trop basse. Ce serait l'échange de gènes avec *B. neohumeralis* (plus tolérante aux basses températures) qui aurait permis à *B. tryoni* d'étendre son aire de répartition plus vers le Sud. Finalement, en augmentant la diversité génétique, l'hybridation pourrait faciliter la radiation adaptative des groupes recombinants formés (Seehausen 2004) qui, eux, pourraient éventuellement devenir de nouvelles espèces (Anderson & Stebbins 1954).

Malgré un nombre grandissant d'études sur les conséquences potentielles de l'hybridation, les processus évolutifs ainsi que le potentiel évolutif de l'hybridation en milieu naturel demeurent encore faiblement explorés. La présente étude utilisera deux espèces d'anguilles dont des hybrides ont déjà été rapportés en nature afin d'explorer le potentiel évolutif de l'hybridation en milieu naturel.

Les anguilles

Historique

Depuis longtemps, l'homme est fasciné par l'anguille et sa biologie particulière. Déjà en 350 av. J.-C., n'ayant jamais observé d'adultes sexuellement matures ou d'événements de reproduction, Aristote l'utilisait comme un exemple parfait de la génération spontanée (Williams & Koehn 1984). Il fallut cependant attendre la fin du 19^e siècle avant de découvrir que les larves en forme de feuilles transparentes observées en mer étaient des larves d'anguille (Williams & Koehn 1984). Une périlleuse expédition de plus de 15 ans menée par le Danois Johannes Schmidt au début du 20^e siècle permit pour la première fois

d'identifier l'aire de reproduction des deux espèces d'anguille de l'Atlantique : les anguilles américaines (*Anguilla rostrata*) et européennes (*A. anguilla*). Ce dernier parcourut l'océan Atlantique de long en large en recueillant le plus possible de leptocéphales, nom donné aux larves des anguilles. Il découvrit que la région où elles étaient les plus jeunes était la mer des Sargasses et ce, pour les deux espèces (Williams & Koehn 1984). Malgré l'avancement important des connaissances depuis la mission de Johannes Schmidt, encore plusieurs facettes de la biologie des anguilles sont inconnues. Entre autres, aucun événement de reproduction en milieu naturel n'a été observé et la phylogénie des 15 espèces d'anguilles réparties à travers le monde est toujours controversée (Lecomte-Finiger 2003).

Cycle biologique

Un des premiers éléments compliquant souvent l'étude des anguilles est leur cycle de vie catadrome. À l'inverse des saumons qui sont anadromes, la majorité des anguilles se reproduisent en mer et passent le reste de leur vie en eau douce. En ce qui a trait à la plupart des anguilles américaines et européennes, elles se reproduisent dans la mer des Sargasses et passent leur vie dans les eaux douces de leur continent respectif. Ainsi, les anguilles américaines sont retrouvées le long de la côte est de l'Amérique du Nord, du Mexique jusqu'au Labrador, de même qu'au Groenland (Avisé 2003). Quant aux anguilles européennes, elles sont distribuées le long de la côte ouest du continent européen, au nord-ouest du continent africain, dans le bassin méditerranéen et en Islande (Avisé 2003).

La vie d'une anguille américaine ou européenne commence dans la mer des Sargasses où des leptocéphales apparaissent à la surface. Ces larves migrent vers leur continent respectif avec les courants du Gulf Stream et de l'Atlantique Nord (le prolongement du Gulf Stream) (McCleave 1993). Les mécanismes de migration sont encore incertains. Certains penchent en faveur d'une migration passive, assumant que les larves n'ont pas suffisamment de réserves d'énergie et qu'elles sont trop petites pour maintenir une nage dirigée pendant la période de migration (McCleave *et al.* 1998). À l'opposé, d'autres, connaissant la grande variabilité interannuelle des courants océaniques dans l'Atlantique, s'expliquent mal la distribution presque parfaite des larves américaines et européennes par une simple dispersion passive et argumentent en faveur d'une nage active (Williams & Koehn 1984).

La durée de la période de migration, difficile à estimer (Cieri & McCleave 2000), pourrait durer une année ou plus chez l'anguille européenne et serait un peu plus courte pour l'anguille américaine. Il a été proposé que la durée de la période larvaire pourrait être responsable de la séparation des larves américaines et européennes sous l'hypothèse d'une migration passive (Arai *et al.* 2000; McCleave 1993). Ainsi, il a été proposé que les larves américaines, se métamorphosant plus vite que les européennes, n'auraient pas le temps de migrer jusqu'au continent européen avant de devenir des civelles et d'entreprendre leur migration en amont des cours d'eau.

Lorsque les larves atteignent une taille donnée (inconnue), ces dernières se métamorphosent en civelle (Otake 2003), migrent vers les côtes et acquièrent de la pigmentation. À ce moment, la plupart des civelles entreprennent une migration en amont des cours d'eau et atteignent leur habitat d'eau douce où elles croîtront, sous la forme communément appelée anguille jaune. Cependant, il arrive que des civelles ne migrent pas en eau douce, mais demeurent plutôt en milieu estuarien ou marin et ce même pendant le stade anguille jaune. Après un certain nombre d'années, lorsque les anguilles jaunes ont atteint une taille suffisante, elles se transforment en anguilles argentées, entreprennent leur maturation et leur migration vers la mer des Sargasses où elles se reproduisent et meurent (Haro 2003; Oliveira 1999).

Aire de reproduction

Les chercheurs et pêcheurs n'ont jamais observé d'événement de reproduction en mer. Ils doivent donc se baser sur la répartition des leptocéphales, vieilles d'à peine quelques jours, pour déterminer l'aire de reproduction approximative des anguilles. Selon les données recueillies jusqu'à présent, l'aire de reproduction des anguilles américaines et européennes se superposent en partie dans le temps et dans l'espace (McCleave 1987), rendant possible l'hybridation entre les deux espèces.

Débat sur le statut des anguilles américaines et européennes

Selon Avise *et al.* (1990), les anguilles américaines et européennes auraient divergé à partir d'un ancêtre commun il y a environ 1,5 millions d'années. Malgré ce temps de divergence considérable, leur morphologie est encore aujourd'hui presque identique. Le seul caractère

méristique permettant de les distinguer est le nombre de vertèbres (Boëtius 1980). En effet, les anguilles américaines possèdent un nombre moyen de vertèbres inférieur (107,2; [103-110]) à celui des anguilles européennes (114,7; [110-119]) (Avisé *et al.* 1990; Boëtius 1980; Williams *et al.* 1984). Les analyses génétiques récentes indiquent qu'elles sont clairement distinctes génétiquement, mais la présence d'hybrides en Islande indique qu'elles ne sont pas totalement isolées (Avisé *et al.* 1990; Williams *et al.* 1984).

Les anguilles de l'Atlantique ont longtemps été perçues comme deux populations isolées de la même espèce. Tucker (1959) affirmait que la différence au niveau du nombre de vertèbres n'était qu'une plasticité phénotypique due à la température de l'eau au cours de leur développement ontogénique et que les deux groupes d'anguilles en Atlantique composaient une seule et même espèce. En 1984, Williams *et al.* s'appuyèrent sur le flux génique observé et sur l'indice de similarité génétique de Nei de 1972 afin de soutenir l'hypothèse d'une seule espèce en Atlantique composée de deux populations largement séparées. Plus récemment, des outils moléculaires plus appropriés ont amené le rejet de l'hypothèse d'une seule espèce et permis d'affirmer que les deux groupes sont effectivement génétiquement distincts (Aoyama *et al.* 2000; Aoyama *et al.* 2001; Avisé *et al.* 1986; Avisé *et al.* 1990). Aujourd'hui, le statut d'espèces distinctes des anguilles de l'Atlantique est généralement accepté (Avisé 2003).

Problématique

En Amérique du Nord et sur le continent européen, les anguilles présentent rarement un nombre ambigu de vertèbres. Cependant, la présence d'individus avec un nombre de vertèbres typique de l'anguille américaine au nord de l'Europe et plus particulièrement en Islande fut reportée à quelques reprises (Avisé *et al.* 1990; Boëtius 1980; Williams *et al.* 1984). Des analyses génétiques indiquèrent que ces individus étaient plus probablement d'origine hybride (Avisé *et al.* 1990). Cependant, la faible répartition géographique des échantillons, le petit nombre d'échantillons ainsi que le manque de résolution des marqueurs génétiques utilisés ont fortement limité les conclusions. En effet, il fut impossible d'évaluer l'ampleur de l'hybridation entre les anguilles américaines et européennes. De même, il fut impossible d'évaluer la distribution des hybrides à l'échelle

de l'Islande ainsi qu'à l'échelle de l'Atlantique. Finalement, aucune donnée ne permet d'évaluer la survie relative des hybrides. Ainsi, ces derniers ne purent déterminer si les hybrides étaient fertiles ou infertiles (cul-de-sac évolutif) de façon à permettre un flux génétique entre les deux espèces.

Objectifs

L'objectif général du projet est d'étudier la dynamique de l'hybridation dans l'optique d'apporter de nouvelles données quant à l'importance de l'hybridation et son impact potentiel dans l'évolution des animaux. Plus précisément, l'utilisation d'espèces dont l'hybridation a déjà été observée en milieu naturel, comme c'est le cas des deux espèces d'anguille de l'Atlantique (*Anguilla rostrata* et *A. anguilla*), vise une meilleure compréhension des conséquences de l'hybridation. Quatre sites d'échantillonnage en Amérique du Nord représentant les anguilles américaines, quatre sites en Europe et en Afrique représentant les anguilles européennes et dix sites distribués dans l'aire de répartition des anguilles en Islande permettront de répondre à quatre objectifs plus précis.

L'identification des individus hybrides permettra premièrement de quantifier l'ampleur de l'hybridation. Deuxièmement, il sera possible de déterminer si l'hybridation se poursuit après la première génération. Troisièmement, la proportion d'hybrides pour deux stades de vie différents sera comparée et des explications potentielles pour les résultats obtenus seront discutées. Finalement, le dernier objectif spécifique sera de déterminer si les hybrides sont distribués au hasard à l'échelle de l'Atlantique de même qu'à l'échelle de l'Islande.

Afin de répondre aux trois objectifs spécifiques, le génotype des individus à 373 loci AFLP sera utilisé pour les classer dans quatre catégories : anguille américaine pure, anguille européenne pure, hybride de première génération (F_1) et hybride de génération supérieure (F_N). Le pourcentage d'individus hybrides pour chacun des sites permettra d'évaluer l'ampleur de l'hybridation de même que la fertilité des hybrides. En comparant la proportion d'hybrides à deux stades de vie différents pour quatre sites en Islande, il sera possible de discuter des différentes hypothèses afin d'expliquer les proportions observées. Finalement, un test statistique permettra de déterminer si les proportions d'hybride étaient

réparties au hasard ou non entre les sites autant à l'échelle de l'Atlantique Nord que de l'Islande.

Chapitre 1 Natural hybrids in Atlantic eels (*Anguilla anguilla*, *A. rostrata*): evidence for successful reproduction and fluctuating abundance in space and time

Résumé français

Les conséquences de l'hybridation dans les processus évolutifs demeurent en grande partie inexplorées chez les animaux. Sachant qu'il y a hybridation entre les anguilles américaines (*Anguilla rostrata*) et européennes (*A. anguilla*), cette étude vise à documenter la dynamique de l'hybridation entre ces deux espèces. Les génotypes AFLP à 373 locus pour 1127 anguilles furent utilisés. Les résultats démontrent que i) une proportion significative (15.5%) des anguilles islandaises sont hybrides, ii) les hybrides de première génération sont fertiles et se reproduisent, iii) en Islande, la survie différentielle est en faveur des hybrides et iv) la distribution des hybrides est quasi-exclusive à l'Islande où leur proportion augmente avec la latitude. Appuyant les modèles de zone hybrides où le succès reproducteur des hybrides dépend de l'environnement, les résultats démontrent que l'hybridation peut influencer les processus évolutifs chez les animaux et que son potentiel évolutif devrait être considéré de façon plus formelle.

Introduction

It is increasingly accepted that aside from the development of stable hybrid zones (Barton & Hewitt 1985), interbreeding between distinct species or populations can result in a variety of evolutionary outcomes, including reinforcement (*sensu* Dobzhansky 1937), genetic extinction (Huxel 1999; Rhymer & Simberloff 1996), speciation (Templeton 1981), enhanced genetic diversity (Rieseberg *et al.* 1999), and novel genetic combinations (Anderson & Stebbins 1954; Arnold 2004; Lewontin & Birch 1966; Seehausen 2004). Moreover, the viewpoint that natural hybridization may play a significant role in animal evolution has been revived in recent years (Arnold 1992, 1997, 2004; Barton 2001; Dowling & Secor 1997; Mallet 2005).

The resulting outcome of natural hybridization is highly variable and depends on the non exclusive pre-mating and post-mating reproductive barriers (Aldridge 2005). Post-mating isolation has been discussed in the recent debate on hybrids' fitness relative to the parental forms in the wild and the evolutionary potential of natural hybridization (Arnold 1997). Hybrid fitness may vary greatly and is inversely proportional to the strength of the barriers. This variability is explained in part by the heterogeneity in space and time of endogenous as well as exogenous post-mating selection pressures (e.g. Grant & Grant 1996), which in turn determine the fate of hybrids relative to the parental forms with which they coexist in a particular environment. Superior hybrid fitness may be due to heterosis via heterozygote advantage, silencing of deleterious recessive alleles or epistatic interactions, while reduced hybrid fitness may be caused by the disruption of coadapted gene complexes. Although heterosis may prevail in the first hybrid generation, hybrid fitness may vary between hybrid classes (Arnold & Hodges 1995) as outbreeding depression accompanied by reduced fitness may occur in subsequent generations (e.g. Edmands 1999; Gharrett *et al.* 1999). While variation in the relative fitness of hybrids has been observed (Arnold & Hodges 1995; Burke & Arnold 2001) and theoretically predicted (Barton 2001), hybrid superiority relative to at least one of the parental forms is increasingly being documented (reviewed in Arnold 1997; Arnold *et al.* 1999).

In controlling the number of hybrids produced, pre-mating reproductive barriers may as well play an important role in determining the genotypic composition and fate of a hybrid zone (Aldridge 2005). These barriers may be of different sources such as spatial, seasonal or behavioral isolation. For instance, the level of reproductive isolation might result from spatial

and/or temporal overlap during reproduction periods (e.g. Bailey *et al.* 2004; Emelianov *et al.* 2001). Environmental factors might as well influence the level of hybridization by reducing the relative reproductive success for one gender in one of the parental form (e.g. Williams *et al.* 2001). Disturbance dynamics which often breakdown the isolating barriers might as well affect the level of gene flow in a specific habitat (e.g. Bleeker & Hurka 2001). Being affected by local ecological conditions, it is the strength and potentially the interaction of isolating barriers that will determine the extent of hybridization between two parental forms. It is therefore necessary to consider potential factors related to both pre-mating and post-mating barriers that will restrict contacts between the two hybridizing species or lineages in order to fully understand the role of natural hybridization in evolution (Bailey *et al.* 2004).

In this study, we document the dynamics of introgressive hybridization between the American and European eels (*Anguilla rostrata* and *A. anguilla*). The life cycle of the two species begins in the Sargasso Sea (North Atlantic Ocean, 19.5-30°N, 48-79°W) where the larvae, called leptocephali, appear at the surface. Leptocephali then passively and perhaps actively follow the Gulf Stream and the North Atlantic drift to reach their respective continent: North America for the American eels and Europe for the European eels. This journey is longer for European compared to American eels and may last from seven months to up to three years depending on authors (reviewed in Arai *et al.* 2000). Once larvae have reached a minimal threshold size, they undergo metamorphosis into glass eel (Otake 2003). The glass eel actively swims towards shore and gradually develops pigmentation. This life stage may last from 20 days to more than 160 days, depending on water temperature and to a lesser extent on salinity conditions (Briand *et al.* 2005; Linton *et al.* in press). Once glass eels have lost their transparency, they are called elvers and later on yellow eels. Yellow eels are able to adapt and exploit almost all aquatic habitats, from coastal environments to headwaters. Feunteun *et al.* (2003) identified four different movement behaviors of eels during their yellow eel stage: founders, pioneers, home range dwellers and nomads. All those behaviors represent different life strategies towards reaching a minimal threshold size before migrating back to the spawning grounds. After three to 20 years spent in their feeding grounds as yellow eels (Aoyama & Miller 2003), at the onset of maturation, they metamorphose into silver eels and begin their migration to the Sargasso Sea, where they reproduce and die.

Spawning grounds of both species overlap in space and time (McCleave *et al.* 1987), thus setting the stage for interbreeding. Although their biological species status is not debated anymore, Atlantic eels differ only slightly in morphology (Avisé 2003), vertebrae count being the only quasi-diagnostic phenotypic character (Boëtius 1980). In North America and continental Europe, eels rarely present ambiguous vertebrae counts. However, the occurrence of eels with American-like number of vertebrae in Northern Europe, and particularly in Iceland has been pointed out previously (Avisé *et al.* 1990; Boëtius 1980; Williams *et al.* 1984). Genetic analyses indicated that these eels were most likely of hybrid ancestry (Avisé *et al.* 1990), though the markers used did not allow clarification of their hybrid status (e.g. first or later generation hybrids). This was due to the non-diagnostic nature of the allozyme loci used (*Mdh-2*), and the maternal inheritance of mitochondrial DNA (Avisé *et al.* 1990). In a recent study that aimed to clarify the status of ambiguous Icelandic individuals using microsatellite markers, Mank & Avisé (2003) concluded that “available microsatellite data are inadequate to critically test [the] hypothesis... that some Icelandic eels are of hybrid ancestry”. Sample size and geographic coverage of Icelandic locations were also both very limited in previous studies, allowing the nature of the dynamics of hybridization between Atlantic eel species to remain inconclusive.

In this study, we revisit this question with the amplified fragment length polymorphism (AFLP) characterization of over 1100 eels representing different life stages from both continents, as well as multiple Icelandic locations. The AFLP technique can relatively easily reveal polymorphisms at hundreds of loci, and represents a very efficient technique for hybrid identification between closely related species (Bensch & Akesson 2005; Bensch *et al.* 2002; Congiu *et al.* 2001; Lucchini 2003; Young *et al.* 2001). Hybrid individuals were thus identified and classified in order to document the extent of hybridization, and to test for the occurrence of hybrids beyond the first generation. Secondly, we tested the null hypothesis of no differences in the proportion of hybrid eels between the glass and yellow eel stages in Iceland. Finally, we documented the distribution of hybrids across both continents and within Iceland in order to test the null hypothesis of the random geographic distribution of hybrids.

Materials and Methods

Samples

A total of 1127 eels were analyzed. Icelandic samples (n = 748) were collected from ten sites between 2000 and 2003, covering most of the known geographic distributional range in Iceland (Figure 1, Table 1). From a previous study, genomic DNA of eels was available for eight sampling locations (n = 379); four from North America, three from continental Europe, and one from North Africa (Figure 1, Table 1; see details in Wirth & Bernatchez 2001, 2003). These were considered baseline populations and used to identify the most informative AFLP loci, which were used for assessing the hybrid status of each individual eel.

North American and continental European samples consisted of either all glass eels (BO, GL, MI, MO), or all yellow eels (ME, WY, SJ, EL). Yellow eels represent a mixture of different cohorts, and should therefore represent the average genetic composition at a given location over many years. Temporal genetic variation between cohorts has been reported (Dannewitz *et al.* 2005), however, it is very weak relative to interspecific differences (Wirth & Bernatchez 2003), and should therefore be inconsequential in assessing hybrid status. In Iceland, yellow eels were sampled at all ten locations, whereas glass eels of several cohorts were available at four of these sites (ST, VI, SE, VO), which allowed the comparison of hybrid occurrence at two different life stages. Life stages, sampling years and sample sizes are detailed in Table 1.

AFLP genotyping

Fin clip and muscle tissue samples were digested and total genomic DNA extracted and purified using MultiScreen lysate clearing plate and MultiScreen₉₆ BAC plate from Montage BAC₉₆ Miniprep Kit (Millipore Co.). The AFLP procedure of Vos *et al.* (1995) was followed in order to produce a DNA fingerprint for each of five selective primer combinations (*EcoRI*-AAC/*MseI*-CTA; *EcoRI*-AAC/*MseI*-CTT; *EcoRI*-AGG/*MseI*-CTT; *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTC; *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTT with the *EcoRI* primer bearing the fluorescent dye). Each sample and primer combination was electrophoresed on a Base Station DNA Fragment Analyzer (MJ Research, Inc.), with an internal lane GeneScan®-500 [ROX]TM size standard (Applied Biosystems). Tracking and peak identification was completed using Cartographer DNA Fragment Analysis software (v.1.2.6). DNA fingerprints were smoothed and peaks with intensity over the threshold

value were scored. Unambiguous loci were then identified and selected ($N = 373$) on the basis of reproducibility of fragment size (in base pairs), proximity to other loci, and signal intensity. The software *AFLP-SURV* version 1.0 (Vekemans 2002) was used to calculate the number and proportion of polymorphic loci, as well as the expected heterozygosity (H_j) assuming Hardy-Weinberg equilibrium within each sampling site and grouping (North America, Europe, Iceland). As the occurrence of hybrids may cause deviations from Hardy-Weinberg equilibrium assumption, expected heterozygosity should be interpreted cautiously. Difference in proportion of polymorphic loci between groups was tested by performing a non parametric ANOVA (Kruskal-Wallis method) in SAS (release 8.02; SAS Institute Inc.).

Individual hybrid status

The power of selected loci to discriminate hybrid status was assessed using the population assignment simulator in AFLPOP (version 1.1; Duchesne & Bernatchez 2002). Based on allelic frequencies observed in the North American and European baseline populations, the AFLPOP simulator randomly generated 1000 genotypes of each of the six following categories: pure American, pure European, first generation hybrids (F_1), backcrosses (BC_1 and BC_2), and second generation hybrids (F_2). Those 6000 simulated individuals were then blindly reassigned to their most probable category. Since the probability of erroneous assignment between the BC_1 , BC_2 and F_2 hybrid categories was relatively high (see Results), we subsequently combined these into a single category of later generation hybrids (F_N). Thus we determined the most likely status of all available samples according to four categories: pure American, pure European, first generation hybrid (F_1), and later generation hybrids (F_N).

We then used a version of the *Structure* program adapted to dominant markers (version 2.2; D. Falush *et al.* unpublished) to estimate individual's admixture proportion, in this case the proportion of an individual's genome originating from either the American or the European eel gene pool. The MCMC algorithm implemented in the program clusters individuals into the presumed number of populations, minimizing the Hardy-Weinberg and gametic phase disequilibrium within populations, but also accounting for the genotypic ambiguity inherent in dominant markers such as AFLP (in which the presence of a band does not allow to distinguish between heterozygote and homozygote). Both American and European gene pools were assumed to represent two baseline populations ($k = 2$) without considering the prior information

on the species of origin. American and European eel samples clustered very distinctively into two clusters, except for three American eels (see Results). This confirmed that the assumption of two populations in the admixture model could unambiguously discriminate both species and allow the identification of individuals with hybrid ancestry. All American, European, and Icelandic samples were then run by *Structure*, assuming two populations for 50 000 iterations in the burnin and 50 000 supplementary iterations.

Based on the 90% posterior probability interval of the admixture value, individuals were assigned to the four possible genetic status as follows: pure if their probability interval overlapped with 0 (pure American eel) or 1 (pure European eel), first generation hybrid (F₁) if their probability interval overlapped with 0.5 but not with either 0 or 1, and later generation hybrid if it did not overlap with either 0, 0.5 or 1. This methodology is conservative as it is most likely underestimating the number of later generation hybrids in favor of first generation hybrids and pure American or European eels. Theory predicts that, depending on the pedigree of individuals, some of the later generation hybrids can be characterized by a proportion of both parental gene pools (e.g. American and European eel) which is equal or close to that of a first generation hybrid or pure parental form (e.g. Epifanio & Philipp 1997).

Structure results were then compared to those obtained using the program *NewHybrids* (Anderson & Thompson 2002). Using Bayesian statistics and MCMC, this program computes the posterior probability that each individual belongs to one of the following classes: American, European, F₁, BC₁, BC₂, and F₂ category. The clustering method of this latter program is based on an inheritance model defined in terms of genotype frequencies and is useful when populations are known to consist of pure and recent hybrids. Assuming Jeffrey's like priors for the mixing proportion and the allelic frequencies, the same data set was run for 50 000 iterations in the burnin and 50 000 supplementary iterations.

Hybrid proportion versus life stages and sampling sites

We determined whether there was a difference in the proportion of hybrids between the glass and yellow eel stages by performing a static cohort analysis on eels from the four Icelandic sites where both glass and yellow eels were sampled (ST, VI, SE, VO). The proportion of first generation hybrids, the proportion of later generation hybrids and the total proportion of hybrids

(combining the first and later generation) were compared between the glass and yellow eel stages (CATMOD procedure in SAS release 8.02; SAS Institute Inc.). Assuming a constant rate of hybridization, this cohort analysis is an efficient means to evaluate the relative hybrid fitness, allowing an estimate of the viability of hybrids in natural conditions (Bert & Arnold 1995). However, since we could not assess differential survival during the oceanic stages (larval stage prior to freshwater and silver eel stage following yellow eel metamorphosis), our interpretations are based on differential survival in freshwater only. Moreover, there is currently no data available to evaluate the temporal variation in the proportion of hybrids reaching Iceland. In order to evaluate this possibility, we compared the proportion of hybrids between different time periods according to the life stages and the year eels were sampled. More specifically, we considered that yellow eel samples collected in 2000 were the oldest of all samples and all samples were classified into eight different time periods. We thus considered yellow eels collected in 2000 as belonging to the time period 1, yellow eels collected in 2001 to the time period 2, yellow eels collected in 2002 as eels from the time period 3, and yellow eels collected in 2003 belonging to the time period 4. We considered the glass eel samples collected in 2000 as eels from the time period 5, glass eels collected in 2001 as eels from the time period 6, glass eels collected in 2002 as eels from the time period 7, and finally glass eels collected in 2003 as eels from the time period 8. This allowed to statistically test for heterogeneity in the occurrence of hybrids (F_1 , F_N , and both categories combined) between the different time periods. We used the chi-square (χ^2) permutation method of Roff & Bentzen (1989) available from the executable MONTE in the REAP program (McElroy *et al.* 1992), with 1000 permutations to determine test significance.

Finally, heterogeneity in the geographic distribution of hybrids, both across continents and within Iceland, was first tested using a chi-square (χ^2) permutation test on the occurrence of pure, first, and later generation hybrid eels. The association between the proportions of hybrids (F_1 and F_N categories combined) among Icelandic yellow eels and latitude was assessed by the Pearson correlation using SAS (release 8.02; SAS Institute Inc.). The two hybrid categories were pooled in order to reduce sampling bias due to the low occurrence of first or later generation hybrid in several sites after confirming the absence of significant difference in the geographic distribution between F_1 and F_N hybrids ($\chi^2 = 13.77$, $p = 0.12$). The correlation

between mean length of eels in each site and latitude was assessed as well (Pearson correlation in SAS).

Results

Individual hybrid status

A total of 373 AFLP loci were resolved among all continental American and European eel samples, of which 120 had a frequency differential of 0.10 or higher between both species. A relatively high polymorphism was observed, whereby, 60% or more of the AFLP loci were polymorphic, depending on sample locations (Table 1). Namely, a highly significant difference in proportion of polymorphic loci was observed between the three sampling groups ($K = 10.14$, $p = 0.0063$), where Icelandic samples were characterized by a higher proportion of polymorphic loci compared to North American and European samples, as would be expected for admixed versus pure gene pools.

Based on the simulation and reassignment procedures performed with AFLPOP using the six eel categories (pure American, pure European, F_1 , F_2 , BC_1 , BC_2), the assignment success for pure American, pure European, and F_1 eels was 98.1, 97.6, and 83.2% respectively. However, misassignment in F_2 , BC_1 , and BC_2 were relatively high: 29.8, 12.3, and 12.6% respectively. In order to reduce misassignment and also increase hybrid sample size for subsequent statistical analyses, F_2 and backcrosses were pooled into a single later generation hybrid category (F_N), which resulted in a misassignment rate of 8.1, 7.6, and 16.4% for the BC_1 , BC_2 , and F_2 respectively, and a misassignment of 8.9% over all status categories.

The results of *Structure* revealed that the geographic distribution of admixture proportion differs substantially among continental American, European, and Icelandic samples (Figure 2, 3, and Table 1). Samples from both continents were essentially composed of eels with either a pure American or European eel genome. Most Icelandic individuals were characterized by a genome of pure European ancestry. However, 15.5% of Icelandic samples were classified as admixed with variable degrees of their genome from American eel ancestry. Hybrid proportion within each yellow eel sample ranged from 6.6 to 100%. No pure American eel was observed among the Icelandic samples. Using this information to assess the genetic status of all individual eels based on the 90% posterior probability interval of the admixture value, the continental European

samples consisted of only pure European eels, while the null hypothesis of pure American ancestry was rejected for three North American individuals. These had estimates of 7, 20, and 21% of their genome from European eel ancestry, and were identified as later generation hybrids (since their 90% probability interval did not overlap either with 0 or 0.5). In contrast, the null hypothesis of pure European eel ancestry was rejected for 15.5% (n = 116) of all Icelandic samples analyzed. A total of 70.7% (n = 82) of putative hybrids in Iceland fell into the first generation category, whereas 29.3% (n = 34) of all hybrids were classified as later generation hybrids, which confirmed the occurrence of hybrids beyond the first generation, and therefore, the viability and capacity of first generation hybrids to reproduce.

The individual status categories obtained from the software *Structure* were confirmed by the software *NewHybrids*, whereby 95% of the 1127 assignments were identical. Moreover, the proportion of each status categories detected by *Structure* and *NewHybrids* in each sampling location did not differ significantly and were highly correlated ($R^2 = 0.979$). Given such a high congruence between both methods, we retained and interpreted the detailed results of *Structure*.

Hybrid proportion versus life stages and sampling sites

The static cohort analysis rejected the null hypothesis of no difference in the proportion of hybrids between glass and yellow eels in Iceland. In seven out of eight comparisons, higher proportions of hybrids in yellow eel relative to glass eel samples were observed the exception being the first generation hybrids in Vogslækur (VO) (Table 2). The categorical model analysis revealed no significant interaction between sampling site and life stage ($p = 0.5461$). Therefore, a main effect model, which did not consider the interaction between sampling sites and life stages, was run. The proportion of hybrids varied significantly among sampling sites ($p = 0.0036$) and between life stages ($p = 0.0155$), but sampling site had no significant effect on the difference in the proportion of hybrids observed between glass eels and yellow eels. On the other hand, the proportion of first generation hybrids and the proportion of first and later generation hybrids combined varied significantly between time periods ($p < 0.001$), while the variation in the proportion of later generation hybrids was near statistical significance ($p = 0.061$; Figure 4). Moreover, a temporal trend was observed whereby the proportion of hybrids reaching Icelandic waters seemed to decrease from 2000 to 2003, based on the analysis of glass

eel samples (time period 5 to 8). The addition of yellow eel samples (time period 1 to 4) further supported this pattern.

A χ^2 permutation test confirmed the non random distribution of hybrids between Iceland and both continents ($\chi^2 = 59.16$, $p < 0.001$). A second analysis based only on Icelandic samples confirmed a highly significant non-random geographic distribution ($\chi^2 = 75.52$, $p < 0.001$). A significantly positive correlation was observed between the proportion of hybrids and latitude, explaining 48.7% of the variance in hybrid proportion ($p = 0.025$; Figure 5). The proportion of explained variance remained high (39%) and near statistical significance ($p = 0.073$) even when removing the Sauðárkrókur sample ($n = 6$) from analysis. The correlation between mean length of eels and latitude explained 21% of the variance and mean length tended to slightly increase with latitude, but was not significant ($p = 0.1826$).

Discussion

The objective of this study was to address three specific questions regarding the dynamics of hybridization between Atlantic eels. We first evaluated the extent of hybridization and tested for the occurrence of hybrids beyond the first generation. Secondly, we tested whether hybrids were randomly distributed across continents and among Icelandic sampling sites. Thirdly, we tested for a difference in the proportion of hybrids between glass eel and yellow eel stages in Iceland. Our results provided evidence for i) an overall hybrid proportion of 15.5% in Iceland, and the existence of hybrids beyond the first generation, ii) a non-random geographic distribution of hybrids in the North Atlantic, and iii) a higher proportion of first and later generation hybrids in the yellow eel stage compared to the glass eel stage, as well as a significant latitudinal gradient in the proportion of hybrids in Icelandic freshwater. Below, we discuss the possible causes and consequences of these findings.

Extent of hybridization and existence of hybrids beyond F_1 generation

Avise *et al.* (1990) previously confirmed the existence of hybrid eels in Iceland. However, limited sample sizes precluded these authors from confidently estimating their proportion. Here, with the hundreds of markers and samples, we found that 15.5% of all Icelandic eels analyzed were of hybrid origin. The broad coverage of sampling sites confirmed that hybrids are ubiquitous in Iceland, being present in all locations, representing nearly half of the eels analyzed

at some sampling sites (100% hybrids in the low sample size taken in SA). In contrast, we found no evidence for the occurrence of introgressed eels in Europe. This result was unexpected, given the previous report of a few European eels with intermediate vertebrae counts (Boëtius 1980). However, the abnormal vertebrae counts (≤ 109) were reported quasi-exclusively in Northern Europe (Iceland, Denmark and Faroes, except for one report in both France and Spain). Our sampling coverage for the northern part of the species distributional range in Europe precludes rigorously ruling out the occurrence of introgressed eels. On the other hand, our results suggest that a small proportion of American eels may be introgressed. Interestingly, the three eels for which a pure American origin was rejected were from the two northernmost sampling sites. This observation, although preliminary, corroborates previous observations that the probability of finding introgressed Atlantic eels may be higher at northern latitudes.

Based on previous studies, it has remained unknown whether hybrids are infertile, and therefore an evolutionary dead end or, in contrast, a possible avenue for maintaining gene flow between American and European eels. This study provides the first evidence for the relatively common occurrence of second or later generation hybrid eels, which represented approximately 30% of all hybrid specimens and approximately 5% of all Icelandic eels analyzed. These proportions demonstrate that hybrids between American and European eels are viable, fertile, and can migrate back to the Sargasso Sea for reproducing beyond the first filial generation.

In situations of contentious species status, hybrid zones have long been recognized as a means to assess taxonomic status. Here, despite temporal and spatial reproductive sympatry and interbreeding, American and European eels remain reproductively isolated and almost entirely genetically distinct, therefore fulfilling the criteria of distinct biological species despite the potential for gene flow between them (Coyne & Orr 2004). Since there are no obvious physical barriers during spawning to prevent hybridization between American and European eels, their persistence as distinct species could result from behavioural and/or ecological reproductive isolating barriers (e.g. Taylor 2004; Young *et al.* 2001), and/or as a result of sufficiently strong natural selection overcoming the homogenizing effects of gene flow (e.g. Schneider *et al.* 1999). In such a case, ecological speciation processes, rather than strict geographic isolation, could be responsible for maintaining the reproductive isolation between American and European eels. This, however, would not necessarily exclude a possible role for past allopatric separation in the

maintenance of their reproductive isolation through endogenous processes, such as the accumulation of genotypic incompatibilities. The nucleotide sequence divergence estimate of 3.7% between the two monophyletic mitochondrial DNA clades that characterize American and European eels (Awise *et al.* 1986) suggests that they evolved in allopatry, perhaps during hundreds of thousands of generations, before their secondary contact. Indeed, the dual role of both historical contingency and ecological determinism has been previously reported in other fishes (Bernatchez *et al.* 1999; Fraser & Bernatchez 2005; Taylor & McPhail 2000).

Geographic distribution of hybrids

The second main observation of this study was the confirmation that both F₁ and later generation hybrid eels are found almost exclusively in Iceland. What factors may be responsible for this pattern? It has previously been documented that American and European eel larvae are not segregated during their migration (Kleckner & McCleave 1985 in Wang & Tzeng 2000) and consequently, it seems unlikely that Icelandic larvae would have their own migration route. Alternatively, interspecific differences in additive genetic basis for adaptive migratory behaviours and/or larval development could result in intermediate migration in hybrids (Rogers *et al.* 2002). Under this scenario, it would therefore be more likely that hybrids would end up in Iceland, which position is somewhat intermediate between both continents. The possibility for oriented swimming of the leptocephali larvae appears unlikely given the small size of larvae, the high current velocity they must cope with, and the large distance to be covered (McCleave *et al.* 1998). Therefore, processes that could be responsible for the higher occurrence of hybrid eels in Iceland are more likely to be associated with developmental schedule and passive drift (McCleave 1987). Studies of daily growth increments indicated that there is a significant difference in larval duration between American and European eels: 200 and 350 days (d) respectively (Wang & Tzeng 2000). Even if the daily deposition on the leptocephali otolith is still contentious (see Cieri & McCleave 2000; Lecomte-Finiger 1994; Wang & Tzeng 2000), there is no doubt that the larval stage duration is longer for the European relative to the American eel. Given that fish larval development is partially under additive genetic control (Rogers & Bernatchez, in preparation), hybrids could spend intermediate time as a larva and therefore be more likely to successfully colonize freshwater habitats at intermediate locations between continents, such as Iceland. Differential growth rate between American (0.21mm/d)

and European eel larvae (0.15mm/d) has also been reported (Wang & Tzeng 2000), which could further increase the probability of colonizing freshwater habitats in intermediate locations between continents. The premigration metamorphosis of yellow eels is timed at both the developmental and behavioural level (Haro 2003), such that eels must reach a minimum threshold size before undertaking their downstream migration (Oliveira 1999). Since minimal threshold size also apparently applies to leptocephali (Otake 2003), and given the interspecific difference in the average size of glass eel (Wang & Tzeng 2000), hybrids with intermediate growth may also be characterized by an intermediate time spent as larvae.

Hybrid proportion in Icelandic samples

Two distinct and confounding patterns were observed regarding the proportion and distribution of hybrids in Iceland. First, the proportion of hybrids was significantly higher in yellow eels compared to glass eels. Then, we also observed a variation in hybrid proportion with year of arrival in glass eels. Since yellow eels were collected approximately in the same time period as the glass eels, the higher hybrid proportion in the yellow eels could result from either a higher survival of eels in Icelandic freshwater and/or to a temporal trend in the reduction of hybrids reaching Iceland. Here, we discuss the potential scenarios that could be responsible for the patterns we observed, given the strengths and limitations of our data set.

Natural selection may influence the hybrids' relative fitness in terms of differential survival, and as such, modulate the observed proportion of hybrids. Examples where first generation hybrids (F_1) showed equal or higher fitness relative to at least one of the parental forms are common in plants (e.g. Burke *et al.* 1998; Campbell 2003; Campbell & Waser 2001; Kirk *et al.* 2005; Orians *et al.* 1999; Song *et al.* 2004), and several examples exist in animals as well (e.g. Emms & Arnold 1997; Grant & Grant 1992; Hotz *et al.* 1999; Parris 2001; Perry *et al.* 2001; Schweitzer *et al.* 2002; Scribner 1993). However, few studies have evaluated relative fitness beyond the first hybrid generation. Most studies directly comparing survival of first and later generation hybrids were performed in laboratory or controlled conditions (e.g. Burgess & Husband 2004; Campbell *et al.* 1998; Facon *et al.* 2005; Fritsche & Kaltz 2000; Gilk *et al.* 2004; Good *et al.* 2000; Hauser *et al.* 2003; Howard *et al.* 1993; Moore & Koenig 1986; Rosenfield *et al.* 2004; Saino & Villa 1992; Vilà & D'Antonio 1998; Wang *et al.* 1997). As a result, the evolutionary processes as well as the potential outcome of hybridization in natural

settings remain largely unexplored in animals (Burke & Arnold 2001; but see Emms & Arnold 1997; Grant & Grant 1992; Perry *et al.* 2001; Schweitzer *et al.* 2002). Here, assuming that the proportion of hybrids arriving in Icelandic waters is relatively constant, the higher frequency of both F₁ and later generation hybrids in yellow eels relative to glass eels would indicate a higher relative survival of hybrids. In animals, higher hybrid survival has previously been documented for the Darwin's finches *Geospiza fortis*, *G. scandens*, and *G. fuliginosa*. Thus, Grant & Grant (1992) compared the survival of natural first and later generation hybrids to the parental forms and observed a higher survival in both categories. Other examples of natural hybrids with a higher relative fitness also exist (e.g. Bert & Arnold 1995; Good *et al.* 2000; Howard *et al.* 1993; Moore & Koenig 1986; Rubidge & Taylor 2004; Saino & Villa 1992). According to environment-dependent hybrid zone models, superior hybrid survival is more likely to be observed in novel habitats or in a novel combination of environmental factors (Howard *et al.* 1993). For instance, when surveying two ecologically differentiated taxa in sedge (*Carex curvula*), Choler *et al.* (2004) found that genotype integrity was maintained in optimal habitats, and that hybrids were favoured in marginal habitats. Genetic introgression was thus considered “as a potential to widen a species' niche”. The situation may be similar for North Atlantic eels. Iceland, where hybrids are observed, is located at the limit of the northern distribution range of the European eel and may therefore be considered as representing a marginal habitat relative to the typical environments to which pure European eels are mainly adapted to.

As recognized earlier by Grant & Grant (1996); “the key to understand the spatial patterning of hybridization and the relative fitness of hybrids could lie in the ecology and breeding behaviour”. Here, we discuss hypothetical ecological and/or behavioural causes that could explain a higher hybrid survival in Iceland. Admittedly, however, the veracity of these hypotheses must await further experimental investigations. European freshwaters are warmer on average than Icelandic waters and the average length of the growing season is longer in continental Europe (Einarsson 1984). A higher hybrid survival raises the hypothesis that hybrid eels with hybrid genotypic combinations could be better adapted (either due to a shift in the mean or an increased variance of a phenotypic trait) than pure European eels to environmental conditions experienced in Iceland, thus increasing survival probability. For instance, American eel face colder winters on average relative to European eels (Seager *et al.* 2002). American eels are thus potentially exposed to a larger range of temperatures than European eels, which could

perhaps provide physiological advantages to hybrid eels relative to European eels in Iceland. Nonetheless, experiments on temperature physiological tolerance and adaptation of Atlantic eels in natural environments are lacking and difficult to realize. Eels in the laboratory typically stop feeding and gradually reduce their activity to complete torpor when exposed to low temperatures (Linton *et al.* in press; Nyman 1972; Sadler 1979; Walsh *et al.* 1983). Moreover, observation varies considerably from one laboratory experiment to the other. For instance, Nyman (1972) reported that European eels did not feed or search for food when temperatures were lower than 14°C and the same observation was made in the American eels (Barila & Stauffer 1980). In contrast, other studies mentioned lower feeding temperatures such as 8°C (Walsh *et al.* 1983) or 10°C (Bruun, 1963 in Nyman 1972).

Secondly, a possible role for natural selection in explaining a higher proportion of hybrids in yellow eels relative to glass eels in Icelandic freshwaters was also suggested by a positive relationship between the proportion of hybrids and latitude. This observation raises the hypothesis of differential survival favouring hybrids that may correlate with a thermal latitudinal gradient. Thus, while there is no good records for freshwater temperature *per se*, it is known that mean water temperature correlates with mean air temperature, and that mean yearly air temperature decreases with latitude in our sampling area, resulting in shorter summers and colder winters at more Northern latitudes (Einarsson 1984). Water temperature has a major influence on eel's metabolism (Sadler 1979), oxygen consumption, and enzyme activities (Walsh *et al.* 1983), as well as behaviours such as feeding, aggression, and habitat selectivity (Barila & Stauffer 1980; Nyman 1972). Therefore, different thermal optima between pure European and hybrid eels could result in differential performance and perhaps survival depending on the thermal regime. Although this possibility cannot be ruled out entirely, it seems less likely that the observed latitudinal gradient in the proportion of hybrids is associated with a variation in the proportion of hybrids arriving in Iceland. First, yellow eel samples were composed of eels from different cohorts, which should buffer the impact of the yearly variation. Second, we found no significant sampling site effect on the size of yellow eels that were collected. Although size only represents an approximation of age, the lack of association between mean eel size and latitude suggests that difference in age between yellow eels from different locations cannot explain alone the latitudinal pattern we observe.

Thirdly, temporal changes in the relative survival of hybrids in the ocean associated with global warming could explain the apparent temporal decrease in the proportion of hybrids arriving in Icelandic waters. For instance, Perry *et al.* (2005) demonstrated that many exploited and non exploited fishes from the North Sea, have responded markedly to recent increase in sea temperature, whereby the distribution of 21 out of 36 species surveyed shifted either in mean latitude, depth or both over the last 25 years. In Atlantic eels, the Den Oever glass eel recruitment index declined markedly since the late 1980s, which coincided with consistently positive sea surface temperature anomalies since then (ICES 2001; Knights 2003). Under the hypothesis that the thermal physiological optima is lower for hybrids relative to pure eel larvae, higher temperature could result in increased relative survival of pure European eels, and in an apparent reduction of the proportion of hybrid eels arriving in Icelandic waters.

An additional, non exclusive cause of the variation in the proportion of hybrids arriving in Iceland could reside in the modification of the oceanic circulation (Knights 2003; Wirth & Bernatchez 2003). Thus, the ongoing warming of the Sargasso Sea / Sub-Tropical Gyre is hypothesized to inhibit spring thermocline mixing and nutrient mixing, which would have marked impact on productivity in the spawning area of the Atlantic eels and could reduce the amount of food available for the leptocephali (Bates 2001). Moreover, modifications in oceanic currents could reduce transport rate and hence probably prolong migration of leptocephali, exacerbating impacts of low nutrition and exposing them for a longer period to predation (Knights 2003). Under the hypothesis that hybrids are genetically intermediate between European and American eels, and knowing that European eels are adapted to a longer oceanic migration period relative to American eels (Arai *et al.* 2000; Wang & Tzeng 2000), it is plausible that ongoing changes in oceanic circulation could result in a lower proportion of hybrids reaching Icelandic waters relative to pure European eels.

Besides differential survival between hybrids and pure European eels, both in freshwater and in the ocean, additional factors may explain the higher proportion of hybrids we observed in yellow eel compared to glass eel samples. Spatial variation in hybrid zone dynamics has been reported in several species (e.g. Aldridge 2005; Bleeker & Hurka 2001; Watano *et al.* 2004; Williams *et al.* 2001). In the same way, temporal variation in the extent of spatial overlap could also result in variation in the extent of hybridization. For instance, Watano *et al.* (2004) found

an important role of the size and position of the distribution gap in two *Pinus* species to explain the differences in level and pattern of introgression in two distinct contact sites. Moreover, Emelianov *et al.* (2001) proposed that year-to-year variation in population densities could be an important factor leading to temporal variation in natural hybridization. Clearly, recruitment in American and European eels has declined sharply in recent decades (Castonguay *et al.* 1994; Dekker 2000; Haro *et al.* 2000; ICES 2001), possibly by up to 90% in some European rivers (Dekker 2003). We propose that such demographic decline could decrease densities of eels on spawning grounds in the Sargasso Sea. Decreased densities could in turn reduce the area of overlap during spawning and therefore, the number of hybrids being produced. The decreasing trend in hybrid proportion arriving in Icelandic waters from 2000 to 2003 tends to support this hypothesis, although a longer time series will be necessary to verify it.

Admittedly, this study does not allow to confidently conclude on the nature of possible causes for the higher proportion of hybrids observed in the yellow eels compared to glass eels in Iceland. However, since pre-mating and post-mating isolating barriers are non exclusive processes, we propose that the combined effect of both differential survival of hybrids and variation in hybridization rate through time may best explain the patterns we observe. Indeed, climate change is impacting many environmental features and could have a determinant effect on the outcome of natural hybridization in Atlantic eels. Moreover, the complexity of Atlantic eels' life cycle, which comprises several critical stages, may exacerbate the impact of environmental conditions on the production and survival of hybrids. Clearly, experimental investigations, as well as additional field data will be necessary for elucidating the role of both selective and demographic factors influencing the dynamics of natural hybridization in Atlantic eels.

Implications for natural hybridization studies

The diverse array of outcomes in hybridizing species calls for more studies of introgressive hybridization in natural environments. This study added to the diversity of possible outcomes of hybridization in that hybridization between American and European eels results in a very unique case of hybrid zone, whereby hybrids are located thousands of kilometres away from where interbreeding occurs. To our knowledge, it is the first documentation of such a hybrid zone. Secondly, this study illustrated that interspecific hybridization is a very dynamic process,

whereby the combination of both pre-mating and post-mating mechanisms may result in pronounced spatio-temporal fluctuations in the proportion of hybrids found in nature. It also suggests that post-F1 hybrids may have higher fitness than parental forms under specific circumstances, and demonstrates that introgressive hybridization is a possible avenue for maintaining gene exchanges between American and European eels. Overall, our results add to the increasing number of studies showing that natural hybridization may play a significant role in adaptation and evolution.

Table 1. Life stage, sampling year, and sample size (n) for each sampling site separately. Proportion of polymorphic loci, expected heterozygosity (Hj), and proportion of pure American (Am), F₁, F_N, and pure European (Eu) for the American, European, and Icelandic samples as well as for each sampling site separately. G represents glass eels and Y, yellow eels. Dash signs (-) indicate no observations in the status category. Population abbreviations are defined in figure 1 legend.

Population	Life stage	Year	n	Polymorphic loci (%)	Hj	Am	F ₁	F _N	Eu
American									
ME	Y	99	45	54.7	0.193	43	-	2	-
BO	G	99	50	52.5	0.193	49	-	1	-
WY	Y	99	48	52.5	0.192	48	-	-	-
SJ	Y	99	50	49.1	0.187	50	-	-	-
total			193	60.3	0.192	190	-	3	-
European									
EL	Y	99	49	52.8	0.193	-	-	-	49
GL	G	99	49	48.5	0.185	-	-	-	49
MI	G	99	45	54.4	0.189	-	-	-	45
MO	G	99	43	61.7	0.195	-	-	-	43
total			186	61.1	0.191	-	-	-	186
Icelandic									
SA	Y	03	6	71.6	0.244	-	6	-	-
VA	Y	00	18	71.6	0.248	-	4	2	12
RE	Y	01	13	75.9	0.217	-	6	-	7
BA	Y	03	49	71	0.210	-	6	-	43
VO	G	00	50	53.6	0.196	-	9	3	38
VO	G	01	50	72.7	0.210	-	4	1	45
VO	G	02	49	52.3	0.191	-	1	-	48
VO	G	03	49	53.1	0.196	-	3	2	44
VO	Y	01	36	70	0.212	-	3	2	31
SE	G	01	48	71.8	0.211	-	7	2	39
SE	Y	01	46	69.4	0.209	-	14	4	28
VI	G	01	50	72.1	0.215	-	4	4	42
VI	Y	02	45	70.5	0.232	-	5	5	35
GR	Y	03	45	71.3	0.222	-	1	2	42
ST	G	01	46	68.6	0.207	-	1	2	43
ST	G	03	50	53.4	0.188	-	-	1	49
ST	Y	03	49	69.7	0.213	-	6	2	41
ÖX	Y	03	49	72.1	0.213	-	2	2	45
total			748	68.1	0.214	-	82	34	632

Table 2. Proportions of pure, first (F_1), and later generation hybrids (F_N) in the glass eel and yellow eel samples collected in Vogslækur (VO), Stokkseyri (ST), Vífilstadavatn (VI), and Seljar (SE).

Site	Life stage	Status category		
		Pure European	F_1	F_N
VI	G	84.0	8.0	8.0
	Y	77.8	11.1	11.1
SE	G	81.3	14.6	4.2
	Y	60.9	30.4	8.7
VO	G	88.4	8.6	3.0
	Y	86.1	8.3	5.5
ST	G	95.8	1.0	3.1
	Y	83.7	12.2	4.1

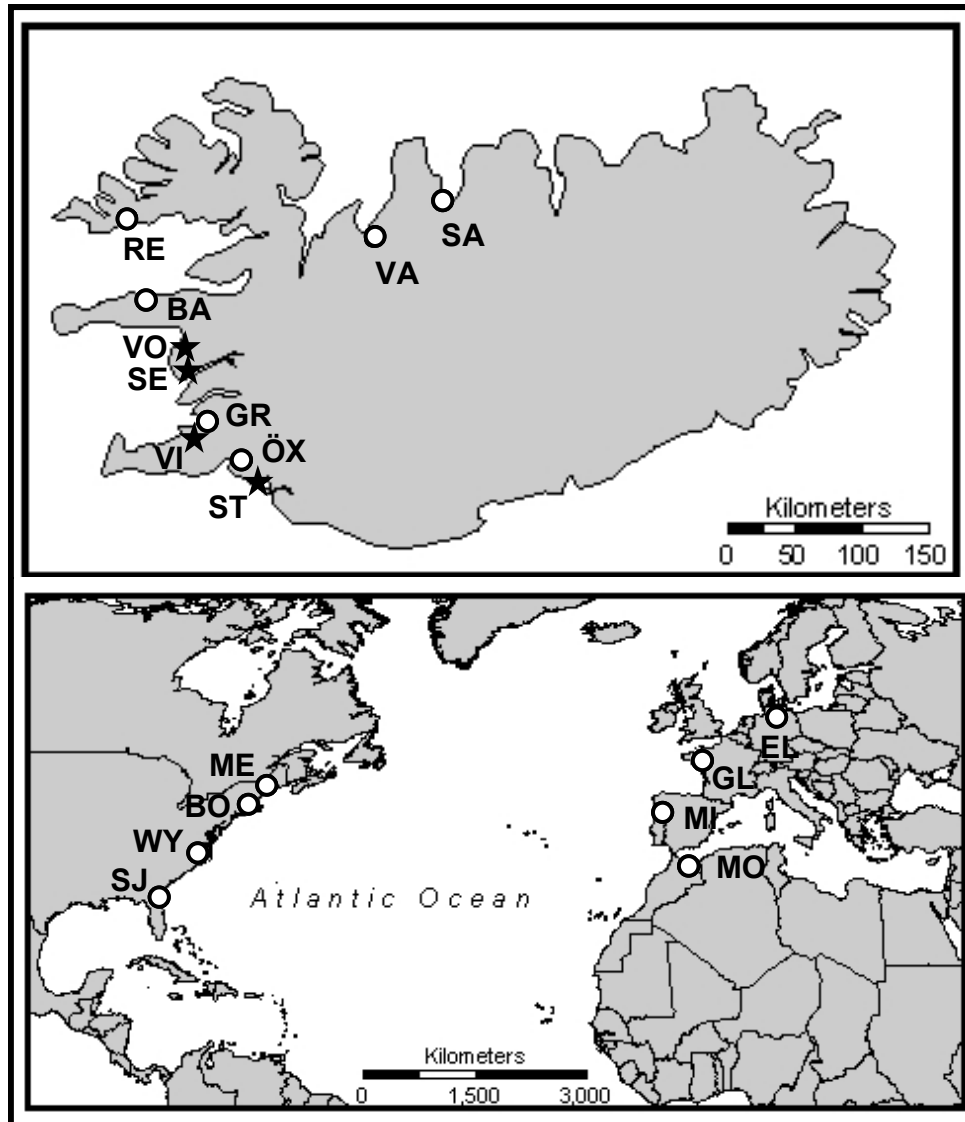


Figure 1. Geographic distribution of eel sampling sites in Iceland (top panel), North America and Europe (bottom panel). Star symbols refer to locations where both glass eels and yellow eels were collected. Icelandic samples are: Öxnalækur (ÖX); Stokkseyri (ST); Grafarvogur (GR); Vífilsstadavatn (VI); Seljar (SE); Vogslækur (VO); Bár (BA); Reykhólar (RE); Vatnsdalur (VA); Sauðárkrókur (SA). North American eel locations: Medomak River (ME); Boston Harbor (BO); Wye River (WY); St-Johns River (SJ). European eel locations: Elbe River (EL); Grand Lieu Lake (GL); Minho River (MI); Moulouya oued (MO).

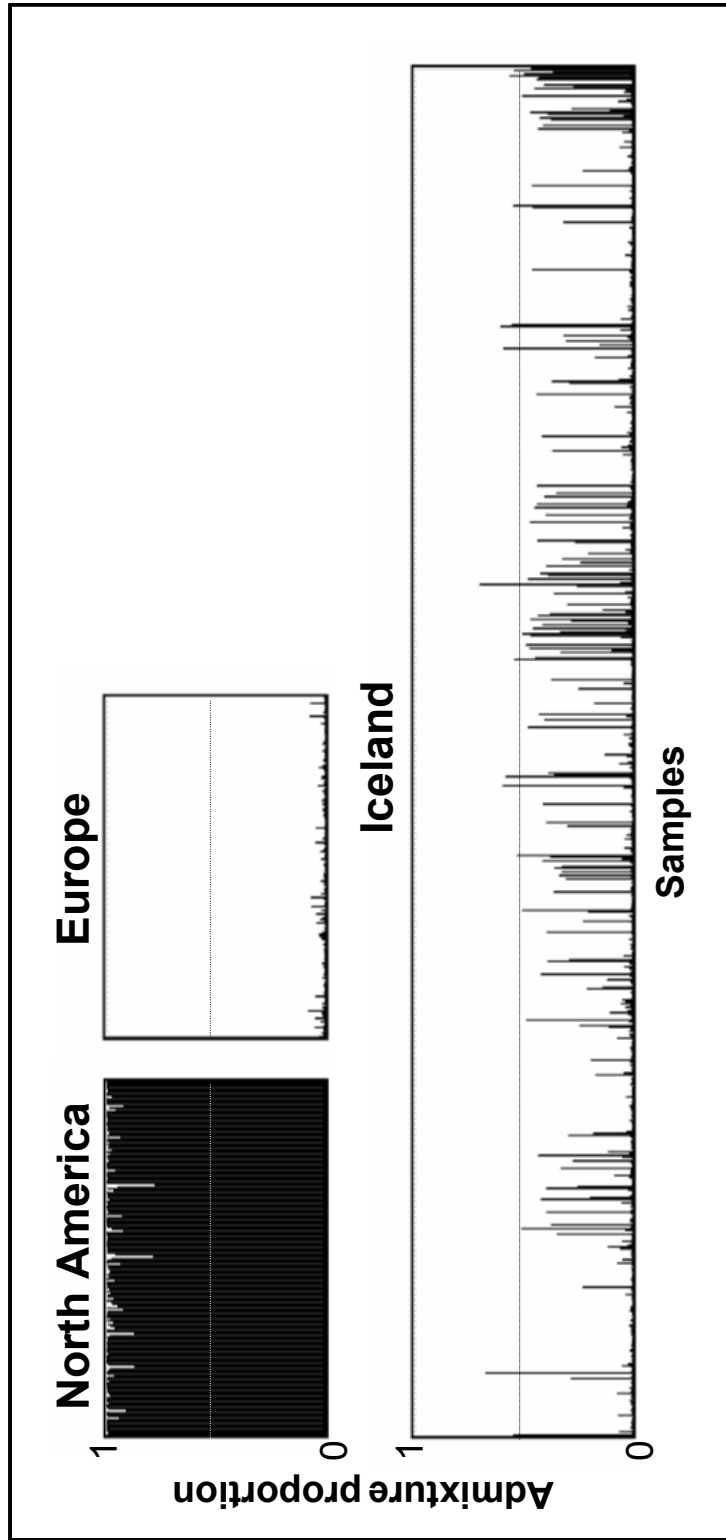


Figure 2. Admixture proportions of North American, European, and Icelandic samples. Each individual is represented by a vertical bar; the proportion of black and white in each bar represents the proportion of the individual's genome from *Anguilla rostrata* (American) and *A. anguilla* (European) ancestry, respectively. The dotted horizontal line indicates the 0.5 admixture level. Null values refer to admixture proportions smaller than 0.001, while 1 refers to admixture values larger than 0.999.

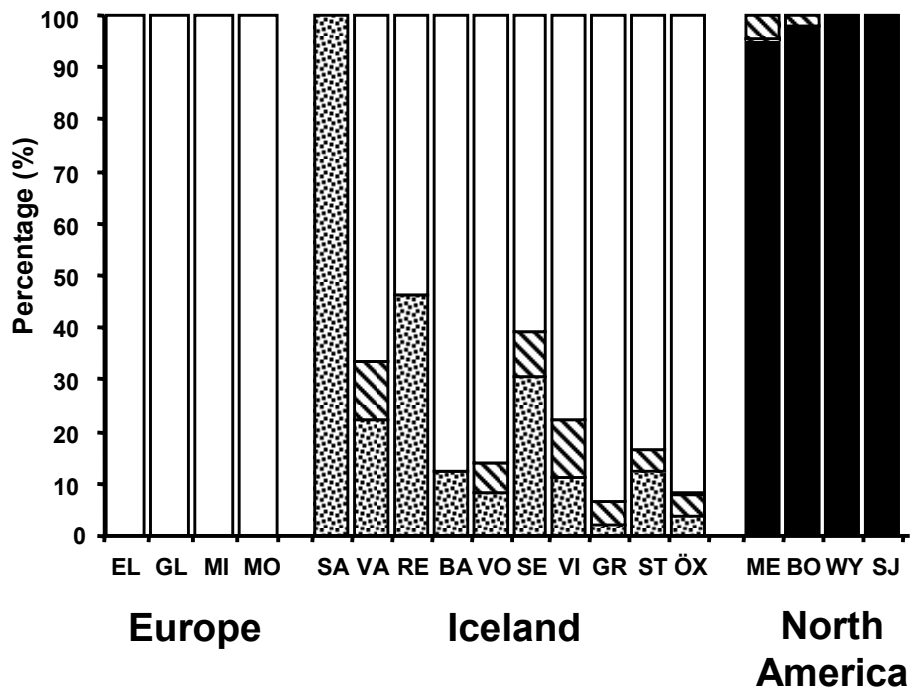


Figure 3. Proportions of pure *Anguilla rostrata* (closed bars), pure *A. anguilla* (open bars), first generation (dotted), and later generation hybrids (striped) within each sampling sites for continental Europe, Iceland, and North America. Population abbreviations are defined in figure 1 legend.

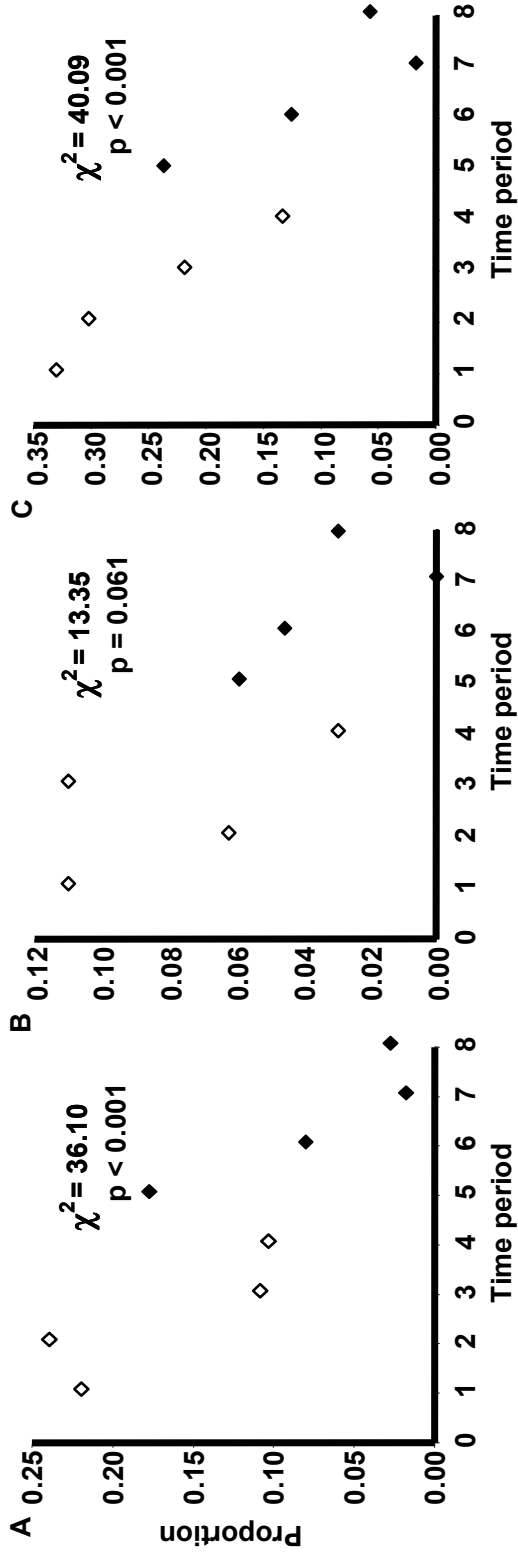


Figure 4. Relationship between the proportion of F₁ (A), F_N (B), or F₁ and F_N combined (C) with time period (defined in Materials and Methods section). Chi-square (χ^2) and p-values are presented. Solid diamonds refer to yellow eel samples and opened diamonds to the glass eel samples.

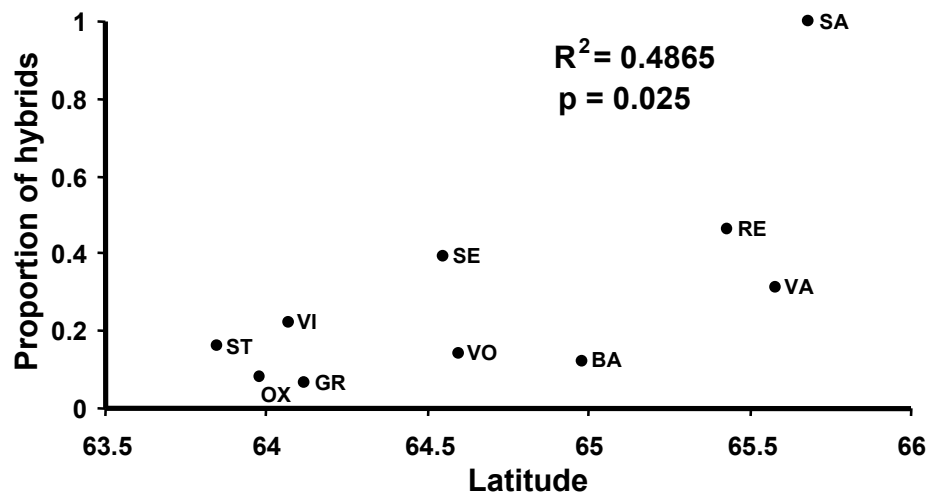


Figure 5. Pearson correlation (R^2) between the proportion of hybrids and latitude (first and later generation hybrids combined) in Icelandic samples.

Conclusion

Le rôle évolutif de l'hybridation a longtemps été nié et est encore aujourd'hui un sujet qui suscite de nombreuses controverses (Arnold 2004; Seehausen 2004). Bien que les études détaillées sur l'hybridation en milieu naturel restent très fragmentaires, l'idée lui attribuant un effet significatif sur l'évolution et la biodiversité du vivant semble être de plus en plus appuyée. Jusqu'à présent, peu d'études ont réussi à évaluer, en nature et chez les animaux, le succès reproducteur relatif des hybrides par rapport à celui des espèces parentales à la première génération hybride de même qu'aux générations subséquentes (Arnold 1997). Il est donc primordial de porter une attention particulière à la question de l'hybridation en milieu naturel afin de mieux débattre de son rôle dans l'évolution des espèces (Arnold 2004).

Quelques individus hybrides ayant déjà été documentés entre les anguilles américaines et les anguilles européennes, ces deux espèces représentaient un excellent modèle pour apporter de nouvelles données sur l'effet de l'hybridation et son impact potentiel dans l'évolution des animaux. L'objectif général de la présente étude était d'évaluer, à l'aide d'analyses génétiques, l'ampleur et la dynamique de l'hybridation entre les anguilles américaines et européennes. Les génotypes multilocus AFLP ont permis de classifier les échantillons en quatre catégories possibles : anguille américaine pure, anguille européenne pure, hybride de première génération et hybride de générations subséquentes. Les résultats ont démontré que i) une proportion considérable (15,5%) des anguilles en Islande est d'origine hybride, ii) les hybrides de première génération sont fertiles et se reproduisent, iii) en Islande, la proportion d'hybrides est plus grande dans le stade anguille jaune et iv) les hybrides en Atlantique sont presque exclusifs à l'Islande où leur proportion tend à augmenter avec la latitude.

La présence d'hybrides de génération supérieure dans tous les sites islandais indique que l'hybridation entre les anguilles américaines et les anguilles européennes ne représente pas nécessairement un cul-de-sac évolutif. En effet, l'incompatibilité génétique, souvent présentée comme argument contre le potentiel évolutif de l'hybridation (Burke & Arnold 2001), ne semble pas être un facteur important dans ce cas-ci. Tout comme les autres anguilles, les hybrides de première génération retrouvent leur chemin vers la mer des

Sargasses où ils s'y reproduisent. La progéniture engendrée est viable et retrouve à son tour sa voie vers un habitat d'eau douce : l'Islande.

De plus, il est important de noter que la proportion d'hybrides est plus grande dans les stades anguilles jaunes par rapport aux stades civelles, et ce, pour les hybrides de première génération de même que pour les hybrides de générations supérieures. Cette plus grande proportion d'hybrides dans le stade de vie plus vieux pourrait être le résultat d'une survie différentielle favorisant les hybrides dans les eaux islandaises ou tout simplement le résultat d'une réduction de la proportion d'hybrides atteignant les eaux islandaises. Dans les deux cas, la sélection naturelle et/ou le taux d'hybridation dans la mer des Sargasses pourraient potentiellement jouer un rôle dans la proportion d'hybrides observée.

La présence d'hybrides presque exclusive à l'Islande amène un élément en faveur de l'hypothèse d'une base génétique additive différente entre les espèces pour la migration. D'ailleurs, il a déjà été démontré que les anguilles américaines ont un stade larvaire significativement plus court que celui des anguilles européennes (Wang & Tzeng 2000). Ainsi, en assumant que la durée du stade larvaire est un caractère déterminé génétiquement et de façon quantitative, les hybrides pourraient avoir une durée du stade larvaire intermédiaire. Cette hypothèse semble plausible, puisqu'en suivant le parcours du Gulf Stream et du courant Atlantique Nord jusqu'en Europe, un temps de migration intermédiaire dirigerait approximativement les larves dans la région de l'Islande. Si cette hypothèse se confirmait, elle pourrait expliquer pourquoi les deux espèces d'anguille demeurent distinctes même si les hybrides se reproduisent et ont une survie relative supérieure aux anguilles européennes en Islande.

En Islande, la tendance de la proportion d'hybride à augmenter avec la latitude suggère qu'un gradient environnemental du Sud vers le Nord influence la survie des hybrides par rapport à la survie des individus purs. Un tel gradient pourrait, par exemple, exister au niveau de la température moyenne qui diminue avec la latitude en Islande (Einarsson 1984) et qui pourrait influencer la survie des anguilles. Ainsi, en supposant que les hybrides ont une meilleure survie que les anguilles européennes pures dans les environnements plus

froids, leur proportion devrait, tel qu'observé, être inversement proportionnelle à la température moyenne du milieu.

Malgré la présence d'hybrides de générations supérieures, les résultats obtenus dans la présente étude viennent renforcer le statut d'espèces biologiques distinctes des anguilles en Atlantique. En effet, bien que l'hybridation entre les deux espèces soit possible et que les hybrides soient fertiles, les deux espèces demeurent clairement génétiquement distinctes. Si les conditions demeurent ainsi, il n'y a pas lieu, à mon avis, de relancer le débat sur le statut des anguilles américaines et des anguilles européennes. Cependant, si le niveau d'introggression augmente et que de plus en plus d'hybrides sont observés sur les continents, le statut d'espèces distinctes devra être questionné à nouveau.

Dans cette optique, il serait intéressant de considérer l'effet de l'environnement sur la dynamique de l'hybridation entre les anguilles de l'Atlantique. D'une part, l'introggression chez ces espèces pourrait être influencée par l'environnement physique de la mer des Sargasses et les courants océaniques. En effet, avec les changements climatiques actuels, les caractéristiques physiques des différentes masses d'eau pourraient être modifiées (Knights 2003). Dans l'éventualité où ce changement dans les masses d'eau amènerait un changement dans la distribution des aires de reproduction, l'aire de reproduction en sympatrie pourrait varier grandement amenant des taux d'hybridation différents. D'autre part, les changements climatiques, de par leur influence sur les courants océaniques (Duplessy 1999), pourraient influencer la migration des leptocéphales induisant potentiellement une modification dans la répartition des anguilles hybrides et des souches parentales. Une modification dans les courants océaniques pourrait aussi modifier l'environnement et changer les pressions de sélection exercées sur les leptocéphales pendant leur migration océanique. La survie relative des hybrides par rapport aux anguilles pures pourrait alors être modifiée.

Finalement, il est important de signaler que la zone hybride documentée dans la présente étude représente un cas unique. Ce caractère unique lui vient du fait que l'habitat occupé par les individus hybrides est situé à des milliers de kilomètres de leur lieu de naissance. Cela implique que les hybrides suivent un patron de migration les menant en Islande ainsi

que, potentiellement, dans les régions avoisinantes. À notre connaissance, jamais ce type particulier de zone hybride n'a encore été documenté.

En somme, la présente étude constitue un exemple appuyant le potentiel évolutif de l'hybridation en milieu naturel chez les animaux. Avec l'augmentation des exemples d'hybridation entre espèces distinctes, il devient de plus en plus difficile d'ignorer que l'hybridation puisse avoir un rôle important dans l'évolution et la biodiversité du vivant. Auparavant, peut-être étions-nous trop aveuglés par l'amalgame des théories qui considéraient rarement l'hybridation en tant que processus évolutif pour se rendre compte de son importance. En considérant plus sérieusement l'hybridation en milieu naturel, il sera possible de le vérifier. Par ailleurs, l'impact de l'hybridation en milieu naturel est un sujet d'une grande importance dans le domaine de la conservation de la biodiversité. L'hybridation peut être indésirable lorsque qu'elle est causée par des facteurs anthropogéniques ou qu'elle mène à l'extinction génétique d'une lignée. Cependant, l'hybridation peut aussi avoir des effets positifs sur la diversité biologique en favorisant l'échange de matériel génétique ou la création de diversité génétique. Comme l'impact de l'hybridation en milieu naturel est différent pour chaque situation, il est difficile d'établir des règles générales pour la gestion des espèces. Certains considèrent que les populations avec un degré d'introggression ne devraient pas être incluses dans les plans de gestion ou de sauvegarde des espèces menacées alors que d'autres prétendent le contraire. Il y a donc un besoin urgent de déterminer la façon de traiter les populations avec un degré d'introggression léger ou important en gardant en tête que l'important est de préserver les processus évolutifs naturels en cours.

Bibliographie

- Anderson E, Stebbins GL (1954) Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* **8**, 378-388.
- Anderson EC, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* **160**, 1217-1229.
- Aldridge G (2005) Variation in frequency of hybrids and spatial structure among *Ipomopsis* (Polemoniaceae) contact sites. *New Phytologist* **167**, 279-288.
- Aoyama J, Miller MJ (2003) The Silver Eel. In: *Eel Biology* (ed. K. Aida KTKY), pp. 107-117. Springer-Verlag, Tokyo.
- Aoyama J, Nishida M, Tsukamoto K (2001) Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, genus *Anguilla*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **20**, 450-459.
- Aoyama J, Watanabe S, Nishida M, Tsukamoto K (2000) Discrimination of catadromous eels of genus *Anguilla* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the mitochondrial 16S ribosomal RNA domain. *Transactions of the American Fisheries Society*, **129**, 873-878.
- Arai T, Otake T, Tsukamoto K (2000) Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology* **137**, 39-45.
- Arnold ML (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **23**, 237-261.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution* Oxford University Press, Oxford.
- Arnold ML (2004) Transfer and origin of adaptations through natural hybridization: Were Anderson and Stebbins right? *The Plant Cell*, **16**, 562-570.
- Arnold ML, Bulger MR, Burke JM, Hempel AL, Williams JH (1999) Natural hybridization: How low can you go and still be important? *Ecology*, **80**, 371-381.
- Arnold ML, Hodges SA (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents. *Trends in Ecology & Evolution*, **10**, 67-71.
- Avise JC (2003) Catadromous Eels of the North Atlantic: A review of Molecular Genetic Findings Relevant to Natural History, Population Structure, Speciation, and Phylogeny. In: *Eel Biology* (ed. K. Aida KTKY), pp. 31-48. Springer-Verlag, Tokyo.
- Avise JC, Helfman GS, Saunders NC, Hales LS (1986) Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 4350-4354.
- Avise JC, Nelson WS, Arnold J, *et al.* (1990) The evolutionary genetic status of Icelandic eels. *Evolution*, **44**, 1254-1262.
- Bailey RI, Thomas CD, Butlin RK (2004) Premating barriers to gene exchange and their implications for the structure of a mosaic hybrid zone between *Chorthippus brunneus* and *C. jacobsi* (Orthoptera : Acrididae). *Journal of Evolutionary Biology* **17**, 108-119.
- Barila TY, Stauffer JR (1980) Temperature behavioral responses of the American eel, *Anguilla rostrata* (Lesueur), from Maryland. *Hydrobiologia*, **74**, 49-51.

- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, **10**, 551 - 568.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 113-148.
- Bates NR (2001) Interannual variability of oceanic CO₂ and biogeochemical properties in the Western North Atlantic subtropical gyre. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **48**, 1507-1528.
- Bensch S, Akesson M (2005) Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*, **14**, 2899-2914.
- Bensch S, Helbig AJ, Salomon M, Siebold I (2002) Amplified fragment length polymorphism analysis identifies hybrids between two subspecies of warblers. *Molecular Ecology*, **11**, 473-481.
- Bernatchez L, Chouinard A, Lu GQ (1999) Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: whitefish, *Coregonus* sp., as a case study. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 173-194.
- Bert TM, Arnold WS (1995) An empirical test of predictions of two competing models for the maintenance and fate of hybrid zones: Both models are supported in a hard-clam hybrid zone. *Evolution*, **49**, 276-289.
- Bleeker W, Hurka H (2001) Introgressive hybridization in *Rorippa* (Brassicaceae): gene flow and its consequences in natural and anthropogenic habitats. *Molecular Ecology* **10**, 2013-2022.
- Boëtius J (1980) Atlantic *Anguilla*. A presentation of old and new data of total numbers of vertebrae with special reference to the occurrence of *Anguilla rostrata* in Europe. *Dana*, **1**, 93-112.
- Briand C, Fatin D, Ciccotti E, Lambert P (2005) A stage-structured model to predict the effect of temperature and salinity on glass eel *Anguilla anguilla* pigmentation development. *Journal of Fish Biology* **67**, 993-1009.
- Burgess KS, Husband BC (2004) Maternal and paternal contributions to the fitness of hybrids between red and white mulberry (*Morus*, Moraceae). *American Journal of Botany*, **91**, 1802-1808.
- Burke JM, Arnold ML (2001) Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics*, **35**, 31-52.
- Burke JM, Carney SE, Arnold ML (1998) Hybrid fitness in the Louisiana irises: Analysis of parental and F₁ performance. *Evolution*, **52**, 37-43.
- Campbell DR (2003) Natural selection in *Ipomopsis* hybrid zones: implications for ecological speciation. *New Phytologist*, **161**, 83-90.
- Campbell DR, Waser NM (2001) Genotype-by-environment interaction and the fitness of plant hybrids in the wild. *Evolution*, **55**, 669-676.
- Campbell DR, Waser NM, Wolf PG (1998) Pollen transfer by natural hybrids and parental species in an *Ipomopsis* hybrid zone. *Evolution*, **52**, 1602-1611.
- Castonguay M, Hodson PV, Couillard CM, *et al.* (1994) Why is recruitment of the American Eel, *Anguilla rostrata*, declining in the St. Lawrence River and Gulf? *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* **51**, 479-488.
- Choler P, Erschbamer B, Tribsch A, Gielly L, Taberlet P (2004) Genetic introgression as a potential to widen a species' niche: insights from alpine *Carex curvula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 171-176.

- Cieri MD, McCleave JD (2000) Discrepancies between otoliths of larvae and juveniles of the American eel: is something fishy happening at metamorphosis? *Journal of Fish Biology*, **57**, 1189-1198.
- Congiu L, Dupanloup I, Patarnello T, *et al.* (2001) Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon. *Molecular Ecology*, **10**, 2355-2359.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation* Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Dannewitz J, Maes GE, Johansson L, *et al.* (2005) Panmixia in the European eel: a matter of time... *Proceedings of the Royal Society B*, **272**, 1129-1137.
- Dekker W (2000) The fractal geometry of the European eel stock. *ICES Journal of Marine Science* **57**, 109-121.
- Dekker W (2003) Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology* **10**, 365-376.
- Demarais BD, Dowling TE, Douglas ME, Minckley WL, Marsh PC (1992) Origin of *Gila seminuda* (Teleostei, Cyprinidae) through introgressive hybridization: Implications for evolution and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 2747-2751.
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the origin of species* Columbia University Press, New York.
- Dowling TE, Secor CL (1997) The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**, 593-619.
- Duchesne P, Bernatchez L (2002) AFLPOP: a computer program for simulated and real population allocation, based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 380-383.
- Duplessy JC (1999) Oceanography - Climate and the Gulf Stream. *Nature*, **402**, 593-594.
- Edmunds S (1999) Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution*, **53**, 1757-1768.
- Einarsson MA (1984) Climate of Iceland. In: *World Survey of Climatology 15: Climates of the oceans* (ed. Loon Hv), pp. 673-697. Elsevier, Amsterdam.
- Emelianov I, Drès M, Baltensweiler W, Mallet J (2001) Host-induced assortative mating in host races of the larch budmoth. *Evolution* **55**, 2002-2010.
- Emms SK, Arnold ML (1997) The effect of habitat on parental and hybrid fitness: Transplant experiments with Louisiana irises. *Evolution*, **51**, 1112-1119.
- Epifanio JM, Philipp DP (1997) Sources for misclassifying genealogical origins in mixed hybrid populations. *Journal of Heredity*, **88**, 62-65.
- Facon B, Jarne P, Pointier JP, David P (2005) Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoides tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 524-535.
- Feunteun E, Laffaille P, Robinet T, *et al.* (2003) A Review of Upstream Migration and Movements in Inland Waters by Anguillid Eels: Towards a General Theory. In: *Eel Biology* (ed. K. Aida KTKY), pp. 191-213. Springer-Verlag, Tokyo.
- Fraser DJ, Bernatchez L (2005) Adaptive migratory divergence among sympatric brook charr populations. *Evolution*, **59**, 611-624.
- Fritsche F, Kaltz O (2000) Is the *Prunella* (Lamiaceae) hybrid zone structured by an environmental gradient? Evidence from a reciprocal transplant experiment. *American Journal of Botany*, **87**, 995-1003.

- Gharrett AJ, Smoker WW, Reisenbichler RR, Taylor SG (1999) Outbreeding depression in hybrids between odd- and even-broodyear pink salmon. *Aquaculture*, **173**, 117-129.
- Gilk SE, Wang IA, Hoover CL, *et al.* (2004) Outbreeding depression in hybrids between spatially separated pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, populations: marine survival, homing ability, and variability in family size. *Environmental Biology of Fishes*, **69**, 287-297.
- Good TP, Ellis JC, Annett CA, Pierotti R (2000) Bounded hybrid superiority in an avian hybrid zone: Effects of mate, diet, and habitat choice. *Evolution*, **54**, 1774-1783.
- Grant BR, Grant PR (1996) High survival of Darwin's finch hybrids: effects of beak morphology and diets. *Ecology*, **77**, 500-509.
- Grant PR, Grant BR (1992) Hybridization of bird species. *Science*, **256**, 193-197.
- Haro A (2003) Downstream Migration of Silver-Phase Anguillid Eels. In: *Eel Biology* (ed. K. Aida KTKY), pp. 215-222. Springer-Verlag, Tokyo.
- Haro A, Richkus W, Whalen K, *et al.* (2000) Population decline of the American eel: Implications for research and management. *Fisheries* **25**, 7-16.
- Harrison RG (1986) Pattern and process in a narrow hybrid zone. *Heredity*, **56**, 337-349.
- Hauser TP, Damgaard C, Jorgensen RB (2003) Frequency-dependent fitness of hybrids between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. rapa* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, **90**, 571-578.
- Hotz H, Semlitsch RD, Gutmann E, Guex G-D, Beerli P (1999) Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclinal frog hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 2171-2176.
- Howard DJ (1986) A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution*, **40**, 34-43.
- Howard DJ, Waring GL, Tibbets CA, Gregory PG (1993) Survival of hybrids in a mosaic hybrid zone. *Evolution*, **47**, 789-800.
- Huxel GR (1999) Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biological Conservation*, **89**, 143-152.
- ICES (2001) Report of the EIFAC/ICES Working Group on Eels, St. Andrews, Canada. ICES CM 2001 / ACFM:03. Copenhagen, Denmark: International Council for Exploration of the Sea, p. 87.
- Kirk H, Vrieling K, Klinkhamer PGL (2005) Maternal effects and heterosis influence the fitness of plant hybrids. *New Phytologist*, **166**, 685-694.
- Knights B (2003) A review of the possible impacts of long-term oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere. *The Science of the Total Environment* **310**, 237-244.
- Lecomte-Finiger R (1994) The early life of the European eel. *Nature*, **370**, 424.
- Lecomte-Finiger R (2003) The genus *Anguilla* Schrank, 1778: current state of knowledge and questions. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **13**, 265-279.
- Lewontin RC, Birch LC (1966) Hybridization as a source of variation for adaptation to new environments. *Evolution*, **20**, 315-336.
- Linton ED, Jonsson B, *et al.* Effects of water temperature on the swimming and climbing behavior of glass eels, *Anguilla* spp. *Environmental Biology of Fishes*, in press.
- Lucchini V (2003) AFLP: a useful tool for biodiversity conservation and management. *Comptes Rendus Biologies*, **326**, S43-S48.

- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 229-237.
- Mank JE, Avise JC (2003) Microsatellite variation and differentiation in North Atlantic eels. *Journal of Heredity*, **94**, 310-314.
- McCleave JD (1987) Migration of *Anguilla* in the ocean: signposts for adults! Signposts for leptocephali? In: *Signposts in the Sea. Proceedings of a Multidisciplinary Workshop on Marine Animal Orientation and Migration* (eds. Herrnkind WF, Thistle AB), pp. 102-117. Florida State University, Tallahassee, Florida.
- McCleave JD (1993) Physical and behavioural controls on the oceanic distribution and migration of leptocephali. *Journal of Fish Biology*, **43**, 243-273.
- McCleave JD, Brickley PJ, O'Brien KM, *et al.* (1998) Do leptocephali of the European eel swim to reach continental waters? Status of the question. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **78**, 285-306.
- McCleave JD, Kleckner RC, Castonguay M (1987) Reproductive sympatry of American and European eels and implications for migration and taxonomy. *American Fisheries Society Symposium*, **1**, 286-297.
- McElroy D, Moran P, Bermingham E, Kornfield I (1992) Reap - an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *Journal of Heredity*, **83**, 157-158.
- Moore WS (1977) Evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review of Biology*, **52**, 263-277.
- Moore WS, Koenig WD (1986) Comparative reproductive success of yellow-shafted, red-shafted, and hybrid flickers across a hybrid zone. *The Auk*, **103**, 42-51.
- Noor MA (1995) Speciation driven by natural selection in *Drosophila*. *Nature*, **375**, 674-675.
- Nosil P, Crespi BJ, Sandoval CP (2003) Reproductive isolation driven by the combined effects of ecological adaptation and reinforcement. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **270**, 1911-1918.
- Nyman L (1972) Some effects of temperature on eel (*Anguilla*) behavior. *Institute of Freshwater Research (Drottningholm, Sweden)*, **52**, 90-102.
- Oliveira K (1999) Life history characteristics and strategies of the American eel, *Anguilla rostrata*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **56**, 795-802.
- Orians CM, Bolnick DI, Roche BM, Fritz RS, Floyd T (1999) Water availability alters the relative performance of *Salix sericea*, *Salix eriocephala*, and their F₁ hybrids. *Canadian Journal of Botany*, **77**, 514-522.
- Otake T (2003) Metamorphosis. In: *Eel Biology* (ed. K. Aida KTKY), pp. 61-74. Springer-Verlag, Tokyo.
- Parris MJ (2001) High larval performance of leopard frog hybrids: Effects of environment-dependent selection. *Ecology*, **82**, 3001-3009.
- Perry WL, Feder JL, Dwyer G, Lodge DM (2001) Hybrid zone dynamics and species replacement between *Orconectes* crayfishes in a northern Wisconsin lake. *Evolution*, **55**, 1153-1166.
- Perry AL, Low PJ, Ellis JR, Reynolds JD (2005) Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* **308**, 1912-1915.

- Pfennig KS (2003) A test of alternative hypotheses for the evolution of reproductive isolation between spadefoot toads: Support for the reinforcement hypothesis. *Evolution*, **57**, 2842-2851.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 83-109.
- Ridley M (1997) Evolution. In: *Oxford Readers*, p. 430. Oxford University press, New York.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**, 359-389.
- Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*, **83**, 363-372.
- Roff DA, Bentzen P (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. *Molecular Biology and Evolution*, **6**, 539-545.
- Rogers SM, Gagnon V, Bernatchez L (2002) Genetically based phenotype-environment association for swimming behavior in lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis* Mitchell). *Evolution*, **56**, 2322 - 2329.
- Rosenfield JA, Nolasco S, Lindauer S, Sandoval C, Kodric-Brown A (2004) The role of hybrid vigor in the replacement of Pecos pupfish by its hybrids with sheepshead minnow. *Conservation Biology*, **18**, 1589-1598.
- Rubidge EM, Taylor EB (2004) Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*). *Molecular Ecology*, **13**, 3735-3749.
- Rundle HD, Schluter D (1998) Reinforcement of stickleback mate preferences: Sympatry breeds contempt. *Evolution*, **52**, 200-208.
- Sadler K (1979) Effects of temperature on the growth and survival of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology*, **15**, 499-507.
- Saetre GP, Moum T, Bures S, *et al.* (1997) A sexually selected character displacement in flycatchers reinforces premating isolation. *Nature*, **387**, 589-592.
- Saino N, Villa S (1992) Pair composition and reproductive success across a hybrid zone of carrion crows and hooded crows. *The Auk*, **109**, 543-555.
- Salzburger W, Baric S, Sturmbauer C (2002) Speciation via introgressive hybridization in East African cichlids? *Molecular Ecology*, **11**, 619-625.
- Schneider CJ, Smith TB, Larison B, Moritz C (1999) A test of alternative models of diversification in tropical rainforests: ecological gradients vs. rainforest refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 13869-13873.
- Schweitzer JA, Martinsen GD, Whitham TG (2002) Cottonwood hybrids gain fitness traits of both parents: a mechanism for their long-term persistence? *American Journal of Botany*, **89**, 981-990.
- Scribner KT (1993) Hybrid zone dynamics are influenced by genotype-specific variation in life history traits: experimental evidence from hybridizing *Gambusia* species. *Evolution*, **47**, 632-646.
- Seager R, Battisti DS, Yin J, *et al.* (2002) Is the Gulf Stream responsible for Europe's mild winters? *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, **128**, 2563-2586.

- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptative radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 198-207.
- Servedio MR (2004) The what and why of research on reinforcement. *Plos Biology*, **2**, 2032-2035.
- Song ZP, Lu B-R, Wang B, Chen JK (2004) Fitness estimation through performance comparison of F₁ hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O. sativa*. *Annals of Botany*, **93**, 311-316.
- Taylor EB (2004) Evolution in mixed company: evolutionary inferences from studies of natural hybridization in Salmonidae a review of hybridization in salmonid fishes. In: *Evolution in salmonids* (eds. Hendry AP, Stearns S), pp. 232-263. Oxford University Press, Oxford.
- Taylor EB, McPhail JD (2000) Historical contingency and ecological determinism interact to prime speciation in sticklebacks, *Gasterosteus*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **267**, 2375-2384.
- Templeton AR (1981) Mechanisms of speciation - a population genetic approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **12**, 23-48.
- Tucker DW (1959) A new solution to the Atlantic eel problem. *Nature*, **183**, 495-501.
- Vekemans X (2002) AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Vilà M, D'Antonio CM (1998) Hybrid vigor for clonal growth in *Carpobrotus* (Aizoaceae) in coastal California. *Ecological Applications*, **8**, 1196-1205.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407-4414.
- Walsh PJ, Foster GD, Moon TW (1983) The effects of temperature on metabolism of the American eel *Anguilla rostrata* (Le Sueur): compensation in the summer and torpor in the winter. *Physiological Zoology*, **56**, 532-540.
- Wang CH, Tzeng WN (2000) The timing of metamorphosis and growth rates of American and European eel leptocephali: a mechanism of larval segregative migration. *Fisheries Research*, **46**, 191-205.
- Wang H, McArthur ED, Sanderson SC, Graham JH, Freeman DC (1997) Narrow hybrid zone between two subspecies of big sagebrush (*Artemisia tridentata*: Asteraceae). IV. Reciprocal transplant experiments. *Evolution*, **51**, 95-102.
- Watano Y, Kanai A, Tani N (2004) Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *Pentaphylla* (Pinaceae) revealed by molecular hybrid index analysis. *American Journal of Botany* **91**, 65-72.
- Williams JH, Boecklen WJ, Howard DJ (2001) Reproductive processes in two oak (*Quercus*) contact zones with different levels of hybridization. *Heredity* **87**, 680-690.
- Williams GC, Koehn RK (1984) Population genetics of North Atlantic catadromous eels (*Anguilla*). In: *Evolutionary genetics of fishes* (ed. Turner BJ), pp. 529-560. Plenum Press, N. Y.
- Williams GC, Koehn RK, Thorsteinsson V (1984) Icelandic eels: evidence for a single species of *Anguilla* in the North Atlantic. *Copeia*, **1**, 221-223.
- Wirth T, Bernatchez L (2001) Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature*, **409**, 1037-1040.

- Wirth T, Bernatchez L (2003) Decline of North Atlantic eels: a fatal synergy? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **270**, 681-688.
- Young WP, Ostberg CO, Keim P, Thorgaard GH (2001) Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*) and coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*). *Molecular Ecology*, **10**, 921-930.