

Origine des populations de rainette verte (*Hyla* spp.) de l'ouest de la Suisse

Sylvain DUBEY, Sylvain URSENBACHER & Luca FUMAGALLI
Laboratoire de Biologie de la Conservation, Département d'Ecologie et Evolution,
Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland.
E-mail: sylvain.dubey@unil.ch

Origin of tree frog (*Hyla* spp.) populations in western Switzerland. - DNA-based techniques are important tools for species assignment, in particular when identification with morphological criteria is difficult. The aim of this study was to genetically determine the species identity of tree frogs (*Hyla* spp.) populations from western and northern Switzerland (Swiss Plateau), this area being frequently subjected to introductions of species or sub-species from south of the Alps. We sequenced 261 base pairs of the mitochondrial DNA cytochrome b gene from 24 samples of tree frogs from the Swiss Plateau, Ticino (southern Switzerland) and the Dombes region (Ain, France), and compared them with homologous sequences retrieved from DNA databases. The phylogenetic analyses revealed two distinct clades. The first one is represented by samples of Green tree frog (*Hyla arborea*) from the Swiss Plateau, France, Germany and Greece, confirming the current knowledge about the species' distribution. The second clade includes samples belonging to the Italian tree frog (*Hyla intermedia*) from south of the Alps (Ticino and Italy), and unexpectedly from the Grangettes site in western Switzerland. These results suggest the introduction of the Italian tree frog *H. intermedia* north of the Alps, and raise questions about the management of the Grangettes protected area.

Keywords: Hylids - cytochrome b - conservation - invader.

INTRODUCTION

Les fluctuations climatiques liées aux glaciations du Pléistocène, ainsi que la géographie complexe du continent européen, traversé par de nombreuses chaînes montagneuses et bras de mer, ont fortement influencé la répartition actuelle des espèces animales et végétales, ainsi que leur diversification. En effet, les changements climatiques ont conduit les espèces des zones tempérées à se réfugier dans les péninsules européennes (Hewitt, 1999; Taberlet *et al.*, 1998), seuls endroits où les conditions permettaient leur survie, isolant ainsi les différentes populations. Lors des périodes interglaciaires plus favorables (telle que celle actuelle), les espèces ont pu recoloniser les territoires plus au nord, mais ont maintenu leur différenciation en plusieurs groupes génétiques distincts, ces divergences ayant parfois conduit à des processus de spécia-

tion (Hewitt, 2001). Ces événements expliquent notamment la présence en Suisse d'espèces et de sous-espèces différentes entre le nord et le sud des Alpes (Tessin). Par exemple chez les reptiles, la sous-espèce *muralis* du Lézard des murailles (*Podarcis muralis*) se trouve au nord des Alpes, alors que la sous-espèce *maculiventris* est localisée uniquement au sud des Alpes. La situation est comparable pour la Couleuvre vipérine (*Natrix maura*) présente le long du bassin du Rhône et la Couleuvre tesselée (*Natrix tessellata*) naturellement limitée au sud des Alpes (Hofer *et al.*, 2001). Chez les Amphibiens, des observations analogues peuvent être effectuées entre la sous-espèce *vulgaris* du Triton lobé (*Triturus vulgaris*) et la sous-espèce *meridionalis*, ou le Triton crêté (*Triturus cristatus*) et le Triton crêté italien (*Triturus carnifex*).

Actuellement, l'homme influence fortement la distribution des espèces, notamment en détruisant et en fragmentant l'habitat ainsi qu'en introduisant des espèces de manière volontaire ou involontaire (espèces invasives). Dans l'ouest de la Suisse, nous pouvons citer comme exemple les introductions et l'établissement de populations de Triton crêté italien (*T. carnifex*) dans les cantons de Genève et Vaud (Grossenbacher, 1988) ainsi qu'en France voisine, la présence de la sous-espèce *meridionalis* du Triton lobé (*T. vulgaris*) en ville de Genève (Grossenbacher, 1988) ou l'existence de couleuvres tesselées dans le Lavaux vaudois (Hofer *et al.*, 2001).

Chez les rainettes, on retrouve une différenciation spécifique entre le nord et le sud des Alpes, avec la présence de la Rainette verte (*Hyla arborea*) au nord (la répartition de cette dernière allant de l'Espagne à la Turquie, en passant par le nord de la Suisse (Plateau) et le Danemark), alors que la Rainette intermédiaire (*H. intermedia*) la remplace au Tessin et en Italie (Gasc *et al.*, 1997; Grossenbacher, 1988). Cette dernière espèce n'a été présente au nord des Alpes que brièvement et artificiellement suite à un lâcher volontaire sans succès visant à la réintroduction de la «rainette verte» dans le canton de Genève (S. Monbaron, comm. pers.). Actuellement, aucune population de rainettes intermédiaires n'est connue au nord des Alpes. Néanmoins, les différences morphologiques entre les deux espèces présentes en Suisse étant très faibles, sa présence ne peut pas être totalement exclue.

Une manière fiable d'identifier une espèce lorsque les critères morphologiques ne sont pas suffisamment discriminants est le recours à des techniques d'analyse moléculaire, en particulier à la comparaison de séquences d'ADN telles que celle du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b*, celui-ci présentant une bonne résolution aux niveaux inter- et péri-spécifique (Bradley & Baker, 2001).

Afin de clarifier la répartition des deux espèces de rainettes (*H. arborea* et *H. intermedia*) dans différentes régions de la Suisse, ainsi qu'en France voisine, nous avons séquencé une portion du cytochrome *b* de différentes populations. En effet, la détermination précise de l'aire de répartition d'une espèce est un facteur primordial pour une gestion des populations efficace et adéquate, ainsi que pour l'évaluation du degré de menace et la mise en place de mesures de protection telles que l'établissement de listes rouges.

MATÉRIEL ET METHODES

ECHANTILLONNAGE: De 2002 à 2005, 24 échantillons de rainettes *Hyla* spp. (têtards ou prélèvements buccaux) ont été récoltés dans 10 sites suisses répartis dans les secteurs de la Côte lémanique (La Côte), de la rive sud du lac de Neuchâtel (Rive sud), d'Argovie, des Grangettes (delta du Rhône proche de Villeneuve) et au Tessin, ainsi qu'en France (Dombes, Ain; Fig. 1, Tab. 1). Des séquences d'ADN supplémentaires provenant d'individus d'Allemagne, de Grèce et d'Italie ont été obtenues par l'intermédiaire de la banque de données GenBank.

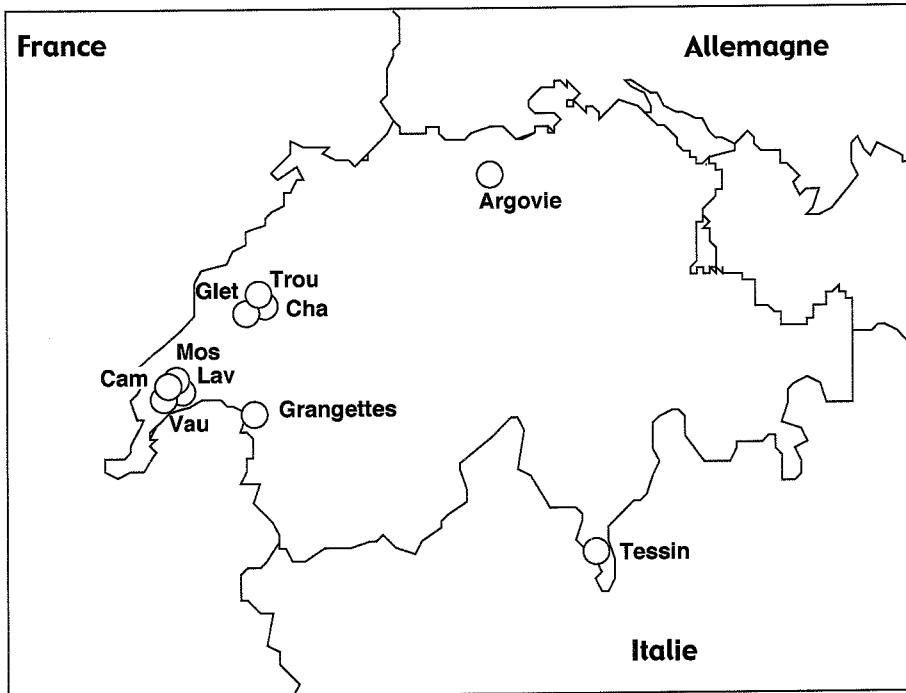


FIG. 1

Localisation des populations suisses analysées dans cette étude. Argovie, Mossière (Mos), Lavigny (Lav), Camp romain (Cam), Vaudalle (Vau), Chabrey (Cha), Gletterens (Glet), Trouville (Trou), Grangettes et Tessin.

EXTRACTION ET AMPLIFICATION DE L'ADN: L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée à l'aide du kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), ainsi qu'avec la technique au CTAB (Milligan, 1992). Un fragment de 261 paires de bases (pb) du gène mitochondrial du cytochrome *b* a été amplifié avec l'amorce H15149 (Kocher *et al.*, 1989), ainsi qu'avec une amorce élaborée dans notre laboratoire (L14861Hyla, 5'-TTTGGCTCCCTACTCGGA-3') dans un volume total de 25 μ l, contenant les produits suivants (concentrations finales): 0.5 U de *Taq* DNA polymérase (Qiagen), 0.2 μ M de chaque amorce, 200 μ M de dNTPs, 1 x tampon PCR Qiagen, 2 μ l du produit d'extraction, ainsi que 1.75 mM de $MgCl_2$. Les réactions PCR ont été effectuées avec 45

TABLEAU 1: Echantillons de *Hyla* spp séquencés dans cette étude ou obtenus de GenBank (*). Sont présentés la localité, l'abréviation des populations (correspondant à la Figure 1), l'haplotype mitochondrial obtenu pour le cytochrome b et le numéro d'accès GenBank.

| Espèce | Localité | Abréviation | Numéro d'accès et Haplotype |
|-----------------------------|------------------------------|---------------|-----------------------------|
| <i>Hyla intermedia</i> | Tessin, Suisse | Tessin 1 | H2, DQ521035 |
| <i>Hyla intermedia</i> | Tessin, Suisse | Tessin 2 | H2, DQ521035 |
| <i>Hyla intermedia</i> | Tessin, Suisse | Tessin 3 | H2, DQ521035 |
| <i>Hyla intermedia</i> | Tessin, Suisse | Tessin 4 | H3, DQ521036 |
| <i>Hyla intermedia</i> | Tessin, Suisse | Tessin 5 | H2, DQ521035 |
| <i>Hyla intermedia</i> | Tessin, Suisse | Tessin 6 | H5, DQ521037 |
| <i>Hyla</i> spp. | Grangettes, Suisse | Grangettes 2 | H5, DQ521037 |
| <i>Hyla</i> spp. | Grangettes, Suisse | Grangettes 3 | H5, DQ521037 |
| <i>Hyla</i> spp. | Grangettes, Suisse | Grangettes 5 | H5, DQ521037 |
| <i>Hyla</i> spp. | Grangettes, Suisse | Grangettes 6 | H5, DQ521037 |
| <i>Hyla</i> spp. | Grangettes, Suisse | Grangettes 7 | H5, DQ521037 |
| <i>Hyla arborea</i> | Mossièrè, La Côte, Suisse | Mos12 | H8, DQ521038 |
| <i>Hyla arborea</i> | Camp romain, La Côte, Suisse | Cam13 | H8, DQ521038 |
| <i>Hyla arborea</i> | Lavigny, La Côte, Suisse | Lav14 | H8, DQ521038 |
| <i>Hyla arborea</i> | Lavigny, La Côte, Suisse | Lav15 | H8, DQ521038 |
| <i>Hyla arborea</i> | Vaudalle, La Côte, Suisse | Vau1 | H8, DQ521038 |
| <i>Hyla arborea</i> | Chabrey, Rive sud, Suisse | Cha 9 | H10, DQ521034 |
| <i>Hyla arborea</i> | Chabrey, Rive sud, Suisse | Cha 11 | H8, DQ521038 |
| <i>Hyla arborea</i> | Gletterens, Rive sud, Suisse | Glet 8 | H10, DQ521034 |
| <i>Hyla arborea</i> | Trouville, Rive sud, Suisse | Trou 4 | H10, DQ521034 |
| <i>Hyla arborea</i> | Argovie, Suisse | Argovie | H8, DQ521038 |
| <i>Hyla arborea</i> | Dombes, France | Dombes 1 | H8, DQ521038 |
| <i>Hyla arborea</i> | Dombes, France | Dombes 2 | H8, DQ521038 |
| <i>Hyla arborea</i> | Dombes, France | Dombes 3 | H9, DQ521039 |
| * <i>Hyla arborea</i> | Axiopouli, Grèce | Grèce | H7, AY093691 |
| * <i>Hyla arborea</i> | Petrade, Allemagne | Allemagne | H8, AY843822 |
| * <i>Hyla intermedia</i> | Italie Nord | Italie Nord 1 | H4, AY093694 |
| * <i>Hyla intermedia</i> | Italie Nord | Italie Nord 2 | H1, AY093693 |
| * <i>Hyla intermedia</i> | Italie Nord | Italie Nord 3 | H2, AY093692 |
| * <i>Hyla intermedia</i> | Italie Sud | Italie Sud | H6, AY093695 |
| * <i>Pseudacris regilla</i> | | | AY363185 |

cycles et les conditions d'amplification suivantes ont été utilisées: 45 sec. de dénaturation à 94°C, 45 sec. d'hybridation à 50°C, 60 sec. d'élongation à 72°C. Les amplifications ont été précédées par 180 sec. de dénaturation initiale à 94°C, et achevées par 5 min. d'élongation finale à 72°C. Un contrôle négatif a été ajouté lors de chaque réaction d'amplification. La présence de produit d'amplification a été vérifiée à l'aide de bromure d'éthidium sur gel d'agarose 1.5%.

SÉQUENÇAGE DE L'ADN: Les produits d'amplification ont été purifiés sur colonnes QiaQuick (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Le séquençage a été effectué à l'aide du ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1.0 (Applied Biosystems) et avec les mêmes amorces utilisées lors de l'amplification (les deux brins d'ADN ont été séquencés). Les réactions de séquence ont ensuite été chargées sur un séquenceur automatique ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Les séquences obtenues ont été déposées dans GenBank, leur numéro d'accès étant DQ521034- DQ521039.

ANALYSES STATISTIQUES: Les séquences nucléotidiques du gène du cytochrome b ont été éditées avec le programme Sequence Navigator (Parker, 1997) et alignées à la main. Trois méthodes d'analyse phylogénétique, à savoir celle du maximum de vraisemblance (maximum likelihood, ML), de parcimonie maximale (maximum parsimony, MP) et une méthode de distance (neighbor-joining, NJ) ont été employées en utilisant le programme PAUP* version 4.0b10 PPC (Swofford, 1998). Les arbres produits par ces analyses ont été enracinés avec une séquence de *Pseudacris regilla* (numéro d'accèsion GenBank: AY363185). Les valeurs de soutien des branches ont été obtenues par ré-échantillonnage (méthode du bootstrap) avec 1000 pseudoréplicats pour les trois approches phylogénétiques. Les distances entre les haplotypes ont été calculées avec la distance de Kimura-2-paramètres (K2P; Kimura, 1980), et les écarts-types des distances de K2P entre les groupes et sous-groupes avec le programme Mega 3.0 (Kumar *et al.*, 2004).

RESULTATS

Dix haplotypes différents possédant 74 caractères variables, dont 47 parcimonieusement informatifs, ont été obtenus à partir des 30 individus de rainette *Hyla* spp. étudiés ou des séquences homologues issues de GenBank (Tab. 1). Les relations entre les haplotypes sont illustrées dans la Figure 2 pour l'analyse ML. Les arbres obtenus par les deux autres méthodes de reconstruction phylogénétique (MP et NJ) ne sont pas montrés, car leur topologie s'est avérée identique à celle obtenue par analyse ML.

Deux groupes distincts, avec un bon support de ré-échantillonnage bootstrap, ont été obtenus (Fig. 2): le premier (G1) est constitué d'individus de *Hyla arborea* provenant de la Rive sud, de La Côte, d'Argovie, des Dombes, d'Allemagne, et de Grèce (valeurs de support pour ML, MP, et NJ: 100%). Le deuxième groupe (G2) rassemble des individus de *Hyla intermedia* (valeurs de support respectivement 77, 70 et 86%); il est lui-même divisé en deux sous-groupes, le premier incluant des échantillons du Tessin, d'Italie du nord, ainsi que les échantillons du site des Grangettes; le deuxième est constitué d'un échantillon du sud de l'Italie. La distance génétique moyenne (K2P) entre G1 et G2 est de 17.2% +/- 2.7% et de 10.5% +/- 2.2% entre les sous-groupes de G2.

DISCUSSION

ORIGINE DES POPULATIONS: Nos résultats confirment les connaissances actuelles concernant la répartition de la Rainette verte (*Hyla arborea*) en Europe (Gasc *et al.*, 1997), les échantillons de Grèce, d'Allemagne, de France, et du Plateau suisse (Côte lémanique, rive sud du lac de Neuchâtel, Argovie) formant un clade monophylétique (G1) peu diversifié génétiquement (distance K2P moyenne: 0.71%) et caractérisé par un support élevé (100%). De même, les Rainettes intermédiaires (*H. intermedia*) forment un groupe monophylétique (G2), soutenu par des valeurs de bootstrap de 70 à 86%, à l'intérieur duquel se distingue un sous-groupe en Italie du sud et un sous-groupe constitué des échantillons du nord de l'Italie, du Tessin, ainsi que, contre toute

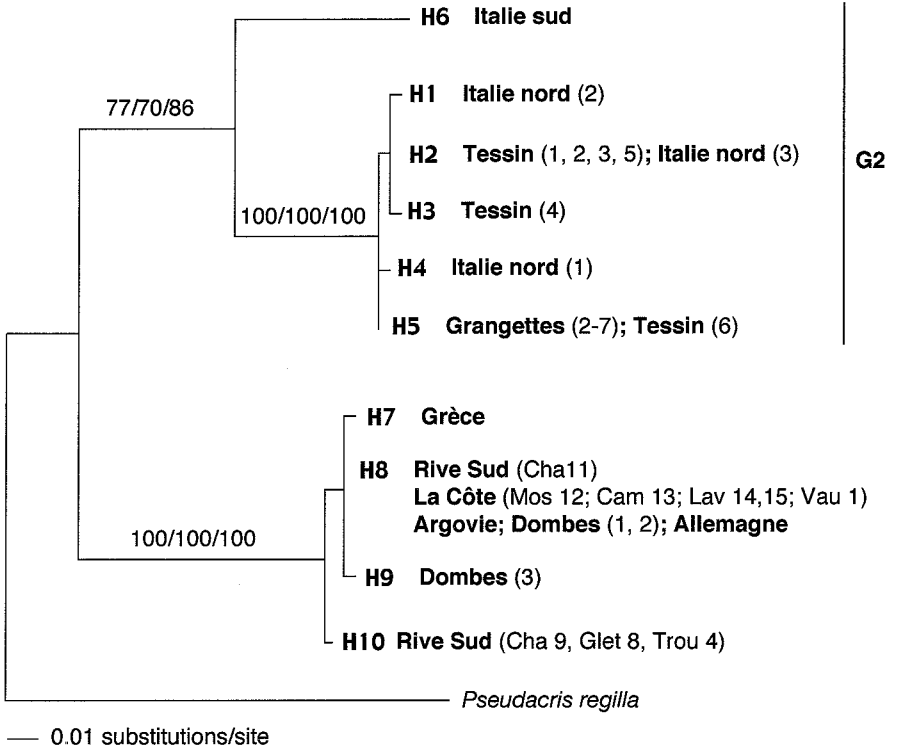


FIG. 2

Phylogénie du fragment du gène du cytochrome b de l'ADN mitochondrial de 261 pb effectuée par le biais de la technique du maximum de vraisemblance (ML). Les chiffres au-dessus des branches principales représentent respectivement les valeurs de ré-échantillonnage bootstrap des analyses ML, MP, et NJ, après 1000 pseudoréplicats. Les codes correspondent au Tableau 1.

attente, des échantillons du site des Grangettes. La présence dans la Péninsule italienne de deux sous-groupes extrêmement différenciés (distance K2P moyenne: 10.5%) suggère l'existence de deux espèces distinctes. Néanmoins, des analyses supplémentaires basées sur plusieurs individus, ainsi que sur d'autres marqueurs génétiques, sont indispensables pour confirmer cette hypothèse.

L'aire de répartition communément admise pour *Hyla intermedia* se limite à la Péninsule italienne et au canton du Tessin. Or la présence d'animaux correspondant génétiquement à cette espèce aux Grangettes, soit au nord des Alpes, est inattendue. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'origine de la population de rainettes intermédiaires dans ce site. La première, en faveur d'une origine naturelle, suggère que *H. intermedia* aurait franchi les Alpes en passant par un ou plusieurs cols. Toutefois, ce scénario nous semble peu probable étant donné les exigences thermophiles de l'espèce. En effet, les seuls amphibiens représentés par la même sous-espèce au nord et au sud des Alpes appartiennent tous à des espèces adaptées à des altitudes élevées (par exemple, le Triton alpestre *Triturus alpestris*, la Grenouille rousse *Rana*

temporaria, et le Crapaud commun *Bufo bufo*), contrairement aux membres du genre *Hyla*. La deuxième hypothèse, plus vraisemblable, plaide pour une origine non naturelle, tel qu'une introduction volontaire ou involontaire par l'homme. La datation de cet événement, qui ne peut pas être effectuée à partir de nos résultats, est par contre difficile à estimer. En effet, cette introduction peut être ancienne et remonter au début de notre ère, lorsque les Romains étaient présents en Valais et les échanges nombreux entre le nord et le sud des Alpes. Une introduction comparable a d'ailleurs été proposée pour expliquer la présence en Valais et au Chablais vaudois de la Couleuvre d'Esculape *Elaphe longissima* (Hofer *et al.*, 2001). Toutefois, une origine plus récente ne peut pas être exclue, soit à partir de lâchers volontaires, soit par l'intermédiaire de plantes ornementales ou de produits horticoles en provenance du sud des Alpes. Des exemples de transports par ce biais de Rainettes méridionales (*H. meridionalis*) depuis le sud de la France sont relativement fréquents dans les centres de jardinage de Suisse (S. Dubey, donnée non publiée) et démontrent qu'un transport passif pourrait expliquer la présence de *H. intermedia* aux Grangettes. Seule l'analyse génétique d'échantillons historiques (collections de musées) de rainettes en provenance du Chablais vaudois ou du canton du Valais permettrait de répondre plus précisément à cette question.

GESTION DE LA POPULATION DES GRANGETTES: Les résultats génétiques obtenus soulèvent plusieurs questions concernant la gestion future de la population de *H. intermedia* du site des Grangettes. La présence de la Rainette intermédiaire au nord des Alpes n'étant vraisemblablement pas naturelle, il est donc envisageable de la considérer comme espèce localement invasive et, en conséquence, d'envisager son éradication, afin de réintroduire ensuite l'espèce qui semble avoir été naturellement présente (*H. arborea*). Dans ce contexte, une solution consisterait notamment à cesser d'entretenir le milieu des Grangettes pendant quelques années, jusqu'à disparition de l'espèce introduite (*H. intermedia*). Cet événement aurait d'ailleurs déjà pu se produire involontairement avant les premiers travaux d'entretien du site effectués en 1994 (Fivat, 2002a). Cependant, une approche qui nous paraît plus avisée serait d'évaluer les risques éventuels posés par la présence de l'espèce invasive sur les populations endémiques de *H. arborea* de l'ouest de la Suisse, risques potentiellement liés à un problème de compétition interspécifique ou à une hybridation entre ces deux espèces. Une étude d'hybridation menée en laboratoire entre la Rainette méridionale (*H. meridionalis*) et la Rainette verte (*H. arborea*), deux espèces européennes bien distinctes (Smith *et al.*, 2005), a par exemple montré la possibilité d'obtenir des hybrides F1 viables (Rosa & Oliveira, 1994). Toutefois, de tels risques semblent négligeables dans le cas particulier du site des Grangettes, puisque cette population est complètement isolée par sa position géographique et les milieux environnants défavorables à l'espèce. Par conséquent, le risque d'expansion de cette population, voire de colonisation des régions du Plateau par *H. intermedia*, nous semble très limité.

Parmi les hypothèses à tester, nous devons également citer la possibilité d'une présence simultanée aux Grangettes de *H. arborea* et *H. intermedia*, et/ou d'hybrides entre ces deux espèces. Le marqueur moléculaire employé dans cette étude (hérité de façon matrilineaire) ne nous permet pas de répondre à ces questions. Des analyses supplémentaires avec un nombre plus important d'échantillons en provenance du site des

Grangettes et du sud des Alpes, et des marqueurs recombinants (par exemple, micro-satellites), seraient nécessaires pour pouvoir clarifier ces points.

La poursuite de la gestion actuelle nous paraît donc être la solution la plus judicieuse, car les interventions effectuées ne servent pas uniquement à protéger cette espèce probablement introduite, mais également à recréer et sauvegarder un type d'habitat devenu rare dans cette région. Or ces habitats sont essentiels à d'autres espèces d'amphibiens, tels que le Triton lobé (*Triturus vulgaris*) et la petite Grenouille verte (*Rana lessonae*), lesquels ont été observés à plusieurs reprises dans les points d'eau aménagés. Les effectifs de cette dernière ont d'ailleurs considérablement augmenté suite à la création de ces milieux (Fivat, 2002b). Ainsi, ces deux espèces doivent partiellement leur présence aux Grangettes aux travaux de gestion et d'aménagement de cette réserve naturelle. L'arrêt de ces derniers provoquerait une forte réduction ou une disparition de ces deux autres espèces d'amphibiens.

REMERCIEMENTS

Tous les prélèvements ont été effectués avec l'accord du KARCH, dont nous remercions les représentants (Silvia Zumbach et Jean-Claude Monney). Nous remercions également la Conservation de la Faune du Canton de Vaud pour les autorisations de capture et de prélèvements, ainsi que J.-M. Fivat, T. Maddalena et J. Pellet.

REFERENCES

- BRADLEY, R. D. & BAKER, R. J. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82: 960-973.
- FIVAT, J.-M. 2002a. Suivi de la colonisation par le complexe des grenouilles vertes (*Rana lessonae*, *Rana Kl. esculenta*, *Rana ridibunda*) dans les nouveaux plans d'eau créés par la Fondation des Grangettes. *Fondation des Grangettes*. Rapport No 37.
- FIVAT, J.-M. 2002b. Suivi de la population de rainettes vertes (*Hyla arborea* L.) dans les réserves gérées par la Fondation des Grangettes, Synthèse 1997-2001. *Fondation des Grangettes*. Rapport 38.
- GASC, J.-P., CABELA, A., CRNOBRNJA-ISAILOVIC, J., DOLMEN, D., GROSSENBACHER, K., HAFNER, P., LESCURE, J., MARTENS, H., MARTÍNEZ RICA, J. P., MAURIN, H., OLIVEIRA, M. E., SOFIANIDOU, T. S., VEITH, M. & ZUIDERWIJK, K. 1997. Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe. Societas Europaea Herpetologica, *Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris*, 498 pp.
- GROSSENBACHER, K. 1988. Atlas de distribution des amphibiens de Suisse. *Centre suisse de cartographie de la faune*, 208 pp.
- HEWITT, G.M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.
- HEWITT, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.
- HOFER, U., MONNEY, J. C. & DUSEJ, G. 2001. Les reptiles de Suisse. *Birkhäuser Verlag*.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- KOCHER, T. D., THOMAS, W. K., MEYER, A., EDWARD, S. V., PAABO, S. & VILLABLANCA, F. X. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animal: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 86: 6196-6200.

- KUMAR, S. K., TAMURA, K. & NEI, M. 2004. MEGA3: An integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefing in Bioinformatics* 5: 150-163.
- MILLIGAN, B. 1992. Plant DNA isolation. (pp. 59-88). *In*: HOEZEL, A. R. (ed.). *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
- PARKER, S. R. 1997. Sequence Navigator. Multiple sequence alignment software. *Methods Molecular Biology* 70: 145-154.
- ROSA, H. D. & OLIVEIRA, M. E. 1994. Genetic Differentiation of the Iberian Tree Frogs *Hyla arborea molleri* and *Hyla meridionalis* (Amphibia, Anura). *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 32: 117-128.
- SMITH, S. A., STEPHENS, P. R. & WIENS, J. J. 2005. Replicate patterns of species richness, historical biogeography, and phylogeny in holarctic treefrogs. *Evolution* 59: 2433-2450.
- SWOFFORD, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other Methods). Version 4.0b1. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- TABERLET, P., FUMAGALLI, L., WUST-SAUCY, A. G. & COSSON, J-F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.