

COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE  
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux

**BIOLOGIE DE LA CONSERVATION D'UNE  
METALLOPHYTE ENDEMIQUE : *VIOLA CALAMINARIA***

Jean-Philippe BIZOUX

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade  
de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteur : G. Mahy  
*Année civile 2006*

© Aux termes de la loi belge du 22 mars 1886, sur le droit de l'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation avec la loi.

**BIZOUX Jean-Philippe (2006) - Biologie de la conservation d'une métallophyte endémique: *Viola calaminaria* - Thèse de doctorat. Gembloux Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques. 132 p., 7 tabl., 29 fig.**

**Résumé**

En Belgique, les sites calaminaires (caractérisés par des sols à hautes teneurs en métaux lourds), qu'ils soient d'origine naturelle (sites anciens) ou anthropiques (sites récents) présentent une valeur conservatoire élevée notamment par la présence d'une flore rare et très spécialisée.

Le but de la présente étude est d'aborder la biologie de la conservation de *Viola calaminaria*, une métallophyte endémique en Région Wallonne, à travers quatre grands points de recherche: l'écogéographie, l'étude du succès reproducteur, la variation génétique de l'espèce et la structure génétique spatiale au sein des populations. Nous avons également évalué la valeur conservatoire des populations récentes par comparaison avec les populations anciennes.

L'étude écogéographique a permis de recenser tous les sites belges hébergeant *V. calaminaria* et de définir la taille des populations (de 0.4 m<sup>2</sup> à 32242 m<sup>2</sup>). Les populations récentes représentent 90 % de la surface. Nous avons également pu confirmer l'endémisme écologique de l'espèce.

L'étude du succès reproducteur n'a pas permis de déceler des stades critiques mais les anciennes populations présentent un succès reproducteur significativement inférieur aux populations récentes. Au niveau génétique, l'espèce présentait un niveau de diversité génétique et de différenciation entre les populations similaires à des espèces aux mêmes traits d'histoire de vie. Aucune différence de diversité génétique n'a pu être trouvée entre les populations anciennes et récentes mais les populations récentes sont moins isolées génétiquement ( $F_{st}$ ). Au sein des populations, la variation génétique est structurée spatialement à très courte distance principalement due à une faible dispersion des graines. Enfin, nous avons montré que la clonalité n'était pas un moyen de reproduction important pour l'espèce même dans des populations avec une forte extension démographique récente.

En conclusion, les populations de *V. calaminaria* apparaissent viables et l'espèce n'est pas menacée par des facteurs intrinsèques. Les populations récentes apparaissent comme essentielles à la conservation de l'espèce.

**BIZOUX Jean-Philippe (2006) – Conservation biology of a endemic methallophyte: *Viola calaminaria* - Thèse de doctorat. Gembloux, Belgium. Gembloux Agricultural University. 132 p., 7 tabl., 29 fig.**

**Abstract**

In Belgium, calamine sites (characterized by soils with high concentrations in heavy metals), that are either naturally (ancient sites) or anthropogenic (recent sites) origin present a high protective value, notably because they host a rare and specialized flora.

The aim of the present study is to investigate the conservation biology of *Viola calaminaria*, an endemic metallophyte in Walloon Region, throughout four research points: an ecogeographic survey, a reproductive success study, the genetic variation in the distribution area of the species and the spatial genetic variation within populations. We have also evaluated the conservation value of recent populations.

The ecogeographic survey has permitted all Belgian sites hosting *V. calaminaria* to be listed and the range of population sizes (from 0.4 m<sup>2</sup> to 32242 m<sup>2</sup>) to be defined. The recent populations represent 90 % of the surface. We have also confirmed the ecological endemism of the species.

The reproductive success study did not permit critical stages to be found but ancient populations display a significant lower reproductive success than recent ones. At the genetic level, the species display similar genetic diversity and population differentiation that species with comparable life history traits. No difference of genetic diversity was found between ancient and recent populations but recent populations show a lower genetic isolation ( $F_{st}$ ). Within populations, genetic variation was spatially structured at very short distance (3 m) mainly due to limited seed dispersal. We have also showed that clonality was not an important mean of propagation even in populations that have recently undergone a rapid demographic extension.

To conclude, *V. calaminaria* populations are viable and the species are not threatened by intrinsic factors. Recent populations are essential for species conservation.



## Remerciements

*Cette thèse est l'aboutissement de plusieurs années de travail. Avant toute chose, je souhaite remercier les personnes sans l'aide de qui cette thèse n'aurait pu être menée à terme.*

*Ce travail a pu être réalisé au Laboratoire d'Ecologie de l'Unité SOL-ÉCOLOGIE-TERRITOIRE grâce à une bourse F.R.I.A. (Fonds de la Recherche Industrielle Appliquée). Je tiens donc à remercier cet organisme pour cette bourse.*

*Le Professeur Grégory Mahy, promoteur de cette thèse, m'a permis d'accéder au monde de la recherche scientifique d'abord lors de mon mémoire de fin d'études et ensuite en tant que doctorant. Il m'a guidé avec pertinence tout au long de ce travail sans jamais faillir à son rôle de promoteur. Sa clairvoyance et ses réflexions critiques ont été une aide très précieuse tout au long de ce travail. Je le remercie également pour sa disponibilité. Je lui en serai toujours reconnaissant.*

*Je tiens également à remercier le Professeur Claude Lefèbvre (ULB, GEV) et Olivier Raspè (Jardin Botanique national à Meise) pour toutes leurs remarques, critiques, et conseils constructifs qui m'ont aidé dans la finalisation des articles et de ce travail. Je les remercie, ainsi que les Professeurs Baudoin Jean-Pierre, Dujardin Patrick et Bock Laurent, d'avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse. Qu'ils sachent à quel point je suis honoré de leur présence dans ce jury. Je remercie également le Professeur Ennos pour les remarques pertinentes et la correction du papier sur la structure génétique.*

*Le travail expérimental en biologie moléculaire a été réalisé au sein de l'Unité de Phytotechnie Tropicale et d'Horticulture. Je tiens donc à remercier Monsieur le Professeur Jean-Pierre Baudoin qui nous a permis d'utiliser les locaux et Monsieur Guy Mergeai, responsable du Laboratoire, pour l'organisation. Je suis aussi très reconnaissant à Gaëtan Rochez, technicien au Laboratoire, pour tous les services rendus, les discussions et ses encouragements lors des multiples mises au point. Merci également à tous les collègues « moléculaires »: Marie, Carmen, Mahama, Carmen, Mariso, et Layla.*

*Je tiens aussi à remercier le laboratoire de Géopédologie, et plus particulièrement Monsieur Gilles Colinet et M<sup>me</sup> Françoise Toussaint pour les analyses de sols réalisées dans le cadre de ce travail.*

*Je tiens également à remercier mes deux TFEistes. D'abord, je remercie Florence Brevers pour la collecte des données de base sur l'espèce et pour toutes ses investigations " d'aménageuse " très précieuses. Toute ma reconnaissance va également à Daïnou Kasso, pour son efficacité au Laboratoire de Biologie Moléculaire, les heures passées à faire des PCR, les longues discussions sur " la génétique de V. calaminaria " mais surtout pour toute son amitié (n'est-ce pas chef!!!).*

*Je voudrais aussi remercier tous mes collègues du Laboratoire d'Ecologie. L'entraide et la bonne humeur de Manu, Nora, Layla, Mariso ou plus récemment de Julien, Arnaud, Sara ou Sonia - pour ne citer qu'eux - ont fait du laboratoire un lieu d'épanouissement professionnel. Merci plus particulièrement à Sonia pour les relectures des deux articles.*

*Enfin, ma famille et mes amis m'ont apporté l'équilibre nécessaire à un tel travail. Je les en remercie. Merci plus particulièrement à mes parents qui m'ont toujours soutenu et guidé dans mes choix. Je voudrais également rendre hommage à mon grand-père, décédé cette année, pour m'avoir inculqué l'amour de la nature et de la " terre ". Merci aussi et surtout à mon épouse, Carlyne, qui m'a d'abord encouragé à commencer cette thèse, qui par son amour m'a rendu la route plus facile et pour tout ce qu'elle représente à mes yeux. Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma gratitude et de mon affection.*

<b>Chapitre 1 : Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Gestion de la biodiversité</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Menaces et extinctions .....	1
1.1.2 Destruction des habitats et fragmentation: effets et conséquences .....	2
1.1.3 Rareté et endémisme .....	5
<b>1.2 La biologie de la conservation</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Ecogéographie des espèces .....	6
1.2.2 Démographie et succès reproducteur .....	7
1.2.3 Les études génétiques, une aide à la gestion des plantes rares ?.....	9
<b>1.3 Le contexte des milieux calaminaires en Belgique</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Les sites calaminaires: généralités, origines et situation géographique.....	11
1.3.2 La flore calaminaire .....	14
1.3.3 Intérêts conservatoires des milieux calaminaires.....	17
<b>1.4 L'espèce étudiée: <i>Viola calaminaria</i></b> .....	<b>19</b>
1.4.1 Classification.....	19
1.4.2 Description botanique et localisation géographique .....	19
1.4.3 Problématique de la classification taxonomique.....	22
<b>1.5 Objectifs de l'étude</b> .....	<b>26</b>
<b>Chapitre 2 : Ecology and conservation of Belgian populations of <i>Viola calaminaria</i>, a metallophyte with a restricted geographic distribution</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1 Introduction</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 Material and methods</b> .....	<b>31</b>
2.2.1 Plant species .....	31
2.2.2 Population survey.....	31
2.2.3 Ecological amplitude of the species.....	32
<b>2.3 Results</b> .....	<b>33</b>
2.3.1 Population survey.....	33
2.3.2 Associated flora and plant communities .....	36
2.3.3 Soil parameters variability .....	37
<b>2.4 Discussion</b> .....	<b>43</b>
<b>Chapitre 3 : Spatial and temporal variation of reproductive success in an endemic metallophyte, <i>Viola calaminaria</i>: implications for conservation</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1 Introduction</b> .....	<b>50</b>
<b>3.2 Material and methods</b> .....	<b>52</b>
3.2.1 Plant species and study sites .....	52
3.2.2 Reproductive success variation within population.....	53

3.2.3	Reproductive success variation at large scale .....	54
3.2.4	Statistical analysis .....	54
<b>3.3</b>	<b>Results .....</b>	<b>56</b>
3.3.1	Habitat characterization .....	56
3.3.2	Spatial and temporal variation of reproductive success at small scale .....	56
3.3.3	Reproductive success variation at large scale .....	60
<b>3.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>62</b>
3.4.1	Effect of vegetation structure and density on the spatial reproductive success variation.....	62
3.4.2	Causes of reproductive success variation at large scale.....	63
3.4.3	Conservation implications.....	64
<b>Chapitre 4 : Genetic variation of <i>Viola calaminaria</i>, an endemic metallophyte, based on RAPD markers: implication of population structure and history.....</b>		<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Material and methods .....</b>	<b>69</b>
4.2.1	Plant material .....	69
4.2.2	DNA extraction and RAPD amplification .....	70
4.2.3	Data analysis .....	71
<b>4.3</b>	<b>Results .....</b>	<b>72</b>
4.3.1	Genetic diversity within populations .....	72
4.3.2	Genetic differentiation .....	73
4.3.3	Comparison ancient/recent populations .....	75
<b>4.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>76</b>
4.4.1	Genetic diversity .....	76
4.4.2	Genetic structure .....	77
4.4.3	Influence of population size and history .....	78
4.4.4	Conservation implications.....	79
<b>Chapitre 5 : Within-population genetic structure and clonal diversity of a threatened endemic metallophyte, <i>Viola calaminaria</i>.....</b>		<b>81</b>
<b>5.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>83</b>
<b>5.2</b>	<b>Material and methods .....</b>	<b>85</b>
5.2.1	Species.....	85
5.2.2	Plant material and population characterization .....	86
5.2.3	Soil analysis .....	86
5.2.4	DNA extraction and RAPD amplification .....	87
5.2.5	Data analysis .....	87



<b>5.3</b>	<b>Results .....</b>	<b>88</b>
5.3.1	Comparisons of soil conditions.....	88
5.3.2	Clonality and genetic structure at small scale.....	89
5.3.3	Large scale within-population structure.....	91
<b>5.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>92</b>
5.4.1	Clonality and genetic structure at small scale.....	93
5.4.2	Large scale within-population structure.....	95
5.4.3	Conservation implication .....	96
<b>Chapitre 6 : Discussion sur les perspectives de conservation de <i>Viola calaminaria</i>.....</b>		<b>97</b>
<b>6.1</b>	<b>Impact des métaux lourds.....</b>	<b>97</b>
6.1.1	Intérêt conservatoire de <i>V. calaminaria</i> et rang taxonomique .....	97
6.1.2	Effet des métaux lourds sur la variation génétique et le succès reproducteur de <i>V. calaminaria</i> .....	99
<b>6.2</b>	<b>Effet de la taille des populations et de leur isolement .....</b>	<b>102</b>
<b>6.3</b>	<b>Impact de l’histoire des populations.....</b>	<b>105</b>
<b>6.4</b>	<b>Implications et pistes pour la conservation.....</b>	<b>107</b>
6.4.1	L'apport scientifique.....	107
6.4.2	Intégration d’autres paramètres.....	109
<b>Références .....</b>		<b>115</b>



## Chapitre 1 : Introduction générale

### 1.1 Gestion de la biodiversité

#### 1.1.1 Menaces et extinctions

Depuis l'apparition de la vie sur terre, des espèces naissent et meurent. Des crises majeures d'extinction ont ainsi ponctué l'histoire de la vie (Lande 1988, Schemske *et al.* 1994, Olivieri et Vitalis 2001). Cependant, la fin du XX<sup>e</sup> siècle et les premières décennies du XXI<sup>e</sup> siècle pourraient bien être le théâtre d'une nouvelle crise de la biodiversité. Les estimations ou les observations directes indiquent que les taux d'extinction des espèces sont de 50 à 1000 fois supérieurs aux taux moyens observés dans les archives paléontologiques (Smith *et al.* 1993, Pimm *et al.* 1995, Primack 1998, Olivieri et Vitalis 2001, Teyssèdre 2004.). Ce qui marque le plus, c'est la rapidité à laquelle se passent ces extinctions. Olivieri et Vitalis (2001) précisent que plus de la moitié des extinctions ayant eu lieu à partir de 1600, se sont passées au XX<sup>e</sup> siècle et selon Pimm *et al.* (1995) la moitié des espèces pourrait disparaître dans les cinquante prochaines années. Chez les Angiospermes (250000 espèces), 384 espèces se seraient éteintes depuis 1600, soit 0.2 % (Primack 1998) dont 270 espèces (0.1 %) se seraient éteintes au XX<sup>e</sup> siècle (Teyssèdre 2004) et 11 % seraient directement menacées. Schemske *et al.* (1994) mentionnent que 25 % des espèces végétales pourraient disparaître dans les 50 prochaines années. Pitman et Jorgensen (2002) arrivent même à 50 %. Les principales causes de cette crise sont: la disparition des habitats, les invasions biologiques, la pollution, la surexploitation des ressources naturelles et l'introduction de maladies. Ces différentes menaces sont étroitement liées aux diverses activités humaines: l'homme est donc directement responsable (Brussard 1991, Olivieri et Vitalis 2001, Teyssèdre 2004).

En plus du critère éthique de l'éradication de formes de vie qui évoluaient depuis des millions d'années et qui ont donc le "droit" de continuer d'exister, il existe des raisons plus pragmatiques de la nécessité de conserver les espèces et notamment les espèces végétales. Celles-ci pourraient être potentiellement utilisées dans les domaines de la médecine, de l'agriculture, de l'industrie, du scientifique ou même du récréatif. Également, à plus long terme, une altération importante des écosystèmes et des êtres vivants qui les composent pourraient déstabiliser les cycles climatiques et bioclimatiques (Lande 1988, Given 1994, Primack 1998). Quatre grandes valeurs sont accordées à la biodiversité (Given 1994, Primack

1998): la valeur d'utilisation directe ou valeur économique (est liée à l'exploitation), la valeur d'utilisation indirecte (bénéfices ne résultant pas de l'exploitation) comme la valeur culturelle ou écologique, la valeur éthique ou valeur intrinsèque (c'est le droit à l'existence) et la valeur d'option (bénéfices potentiels non connus). C'est pourquoi des programmes de conservation *in situ* et *ex situ* visant ces espèces menacées doivent être élaborés prioritairement (Schemske *et al.* 1994, Edwards et Weakley 2001).

Pour répondre à cette demande, une discipline de recherche a émergé: la biologie de la conservation<sup>a</sup>. Elle est considérée comme une science basée sur des éléments d'écologie, de génétique, de biogéographie et d'autres disciplines appliquées traditionnelles (Brussard 1991, Heywood et Iriondo 2003). Elle a pour objectif d'apporter une base scientifique valable aux actions visant à ralentir ou stopper la perte de biodiversité (Brussard 1991). La mise en place de programmes efficaces de conservation des plantes menacées nécessite des études scientifiques à différents niveaux. Trois niveaux d'études sont possibles: les écosystèmes, les espèces et les gènes. Dans le cas de l'étude d'une espèce donnée, l'investigation de son écobiogéographie, en ce compris la distribution de l'espèce, les facteurs environnementaux limitants ainsi que l'impact des activités anthropiques passées et présentes (Dinsdale *et al.* 1997, Heywood et Iriondo 2003) est une première étape. Mais ce n'est pas suffisant. Des connaissances sur la biologie et l'écologie de l'espèce concernée sont également requises. Le but est d'identifier les facteurs qui menacent la viabilité des populations tant au niveau démographique que génétique (Heywood et Iriondo 2003). En clair, il faut identifier les stades critiques du cycle de vie et les facteurs limitants de ces stades (Schemske *et al.* 1994). Malheureusement, ces informations sont souvent inexistantes et des études exhaustives préalables à la prise de mesures de protection ne sont que peu fréquemment envisagées (Edwards et Weakley 2001).

### *1.1.2 Destruction des habitats et fragmentation: effets et conséquences*

La destruction, la dégradation des habitats et leur fragmentation, sont probablement les facteurs les plus déterminants dans le déclin et l'extinction des espèces végétales (Begon *et al.* 1996, Sih *et al.* 2000, Olivieri et Vitalis 2001). Cette perte d'habitats est en grande partie due à l'influence humaine et peut se présenter sous différentes formes.

Il peut y avoir destruction pure et simple de fragments entiers de l'habitat d'une espèce, auquel cas la superficie totale que celle-ci peut occuper diminue. L'habitat peut également

---

<sup>a</sup> Cette discipline émerge de la publication du livre de Soule et Wilco's en 1980: Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective.

être perturbé par les activités humaines et ce, au détriment de certains taxa (Begon *et al.* 1996). Ainsi, il peut aussi arriver que certaines parcelles de l'habitat soient à tel point dégradées que les conditions y deviennent défavorables pour certains taxa.

Enfin, un autre processus majeur qui résulte de la perte d'habitats est la fragmentation entraînant la division d'un habitat original continu en plusieurs fragments isolés les uns des autres (Primack 1998). Tous ces processus ne sont évidemment pas indépendants les uns des autres et interviennent conjointement dans la perte de diversité biologique. Il est indéniable que la dégradation et la fragmentation des habitats, en entraînant une chute des effectifs des populations, constituent une réelle menace pour les espèces (Olivieri et Vitalis 2001). Il ne suffira pas simplement d'identifier la répartition des habitats et la distribution des espèces si l'objectif visé est de maintenir les plantes rares (Edwards et Weakley 2001).

La destruction et la fragmentation des habitats entraînent une diminution de l'effectif et une augmentation de l'isolement spatial des populations. Ces modifications peuvent entraîner les espèces dans une spirale vers l'extinction liée à deux grands processus: la diminution de la taille des populations et la perturbation de la métapopulation.

Les populations de faibles effectifs sont d'avantages sensibles aux variations stochastiques. Quand une espèce est en déclin, des processus dus au hasard interviennent et peuvent la piéger dans une spirale vers l'extinction. Trois processus stochastiques interviennent: la stochasticité démographique, environnementale et génétique (Olivieri et Vitalis 2001):

- 1) processus d'ordre démographique: dans une population, les effectifs évoluent dans le temps. Cette évolution est due aux variations aléatoires des taux de naissance et de mortalité (Lande 1988, Oostermeijer *et al.* 2003).
- 2) processus d'ordre environnemental: les changements temporels mais imprévisibles de l'environnement biologique (exemple: maladie) et/ou de l'environnement physique (exemple: climat), ainsi que les catastrophes naturelles, peuvent altérer facilement les petites populations puisque le nombre d'individus non touchés sera plus faible (Lande 1988, Oostermeijer *et al.* 2003).
- 3) processus d'ordre génétique: à cause de l'effet aléatoire, la fréquence d'un allèle peut fluctuer d'une génération à l'autre. C'est la dérive génétique. Dans des populations de petite taille, un allèle présent à faible fréquence aura donc à chaque génération une probabilité de disparaître plus élevée (Begon *et al.* 1996). Ce phénomène est à la base d'une perte de variabilité allélique (diversité génétique) et d'une augmentation de l'homozygotie. L'augmentation de l'homozygotie permet à certains gènes délétères de

s'exprimer entraînant une dépression de consanguinité. Or, la dépression de consanguinité provoque une diminution du fitness des populations augmentant le risque d'extinction de celles-ci. De plus, la diversité génétique (variabilité allélique) est une garantie du potentiel d'évolution à long terme (Lande 1988, Ellstrand et Elam 1993, Begon *et al.* 1996, Young *et al.* 1996). En effet, une richesse allélique moindre est susceptible de limiter l'aptitude d'une espèce à répondre aux pressions de sélection changeantes (Young *et al.* 1996).

Les petites populations ou les populations de faible densité sont également plus sensibles suite à des effets déterministes. En effet, le succès reproducteur d'une espèce (surtout les espèces allogames) et par conséquent la viabilité de ses populations sont influencés par ce qu'on appelle l'hypothèse de l'effet Allee<sup>b</sup> (Lande 1988, Roll *et al.* 1997). Ainsi, les petites populations isolées sont moins attractives pour les pollinisateurs et des patchs de faible densité en fleurs, au sein des populations, sont également moins attractifs (Sih et Baltus 1987). Ces modifications du comportement des pollinisateurs résultent en une diminution du nombre de visites par les pollinisateurs, ce qui affecte ensuite le taux de fructification et finalement la production de graines (Sih et Baltus 1987, Oostermeijer *et al.* 2003).

En général les espèces persistent sous forme de métapopulations où chaque population n'est pas isolée mais est liée aux autres populations par des flux d'individus ou de pollen. La métapopulation est caractérisée par une dynamique extinction - recolonisation des populations locales (Hanski 1989, Bisteau et Mahy 2005) et la persistance de celle-ci dépend de la balance entre l'extinction des populations dans les taches d'habitats colonisées et la recolonisation des taches d'habitat non occupées (Begon *et al.* 1996, Sih *et al.* 2000). Lors de la fragmentation de l'habitat, l'isolement spatial des populations augmente provoquant une diminution des échanges d'individus ce qui entraîne ensuite l'accroissement des divergences génétiques entre les populations restantes suite à une diminution des flux de gènes (Young *et al.* 1996). Cet isolement mène aussi à terme à une perte de diversité génétique au sein des populations car la dérive génétique n'est plus compensée par des apports de gènes extérieurs (Young *et al.* 1996, Oostermeijer *et al.* 2003). En biologie de la conservation, il est donc préférable de ne pas se limiter à une seule tache d'habitats et d'étudier la structure de la métapopulation: le nombre et la taille des populations qui la composent, l'arrangement spatial et la variation génétique des populations.

---

<sup>b</sup> Allee effect: chez les plantes, cet effet implique la difficulté des ovules d'être fertilisés suite à des petites populations ou des faibles densités dans les populations (Oostermeijer *et al.* 2003).

A l'opposé, l'activité humaine peut favoriser la création de nouveaux habitats pour une espèce qui, colonisés, permettent l'apparition de nouvelles populations modifiant la structure de la métapopulation. Ces changements s'accompagnent d'effets tant sur la variation génétique que sur la reproduction de l'espèce. En effet, la création de ces nouvelles populations s'accompagne souvent d'effet de fondation<sup>c</sup> important (colonisation par un nombre restreint d'individus) pouvant entraîner une faible diversité génétique dans ces populations (Nei *et al.* 1975, Mengoni *et al.* 2000, Krüger *et al.* 2002). Ces changements peuvent aussi d'une part influencer les flux de gènes et modifier la structure génétique (Krüger *et al.* 2002, Leimu et Mutikainen 2005) et, d'autre part, fortement influencer la "fitness" et le succès reproducteur des populations (Leimu et Mutikainen 2005). Enfin, le système de reproduction de l'espèce peut aussi évoluer notamment par la modification de la balance reproduction sexuée/végétative (Travis *et al.* 2004) ou de l'auto-fertilité (Leimu et Mutikainen 2005).

### 1.1.3 Rareté et endémisme

Les termes de rareté et d'endémisme sont couramment employés en biologie de la conservation. Ils reflètent des notions différentes mais néanmoins liées.

Un taxon (souvent une espèce) est endémique d'une région s'il se trouve à l'intérieur de cette région et nulle part ailleurs (Kruckeberg et Rabinowitz 1985). La notion d'endémisme est toujours liée à une région géographique particulière, c'est une notion de biogéographie (Kruckeberg et Rabinowitz 1985). Par exemple, certains taxons sont endémiques continentaux ou régionaux. Cette notion n'implique donc pas toujours la rareté du taxon et sa distribution limitée. Par contre, les endémiques locales ou à distribution étroite se lient plus au concept de rareté (Kruckeberg et Rabinowitz 1985). On parle aussi d'endémisme écologique, pour une espèce liée à des conditions écologiques particulières.

La notion de rareté est plus délicate à définir. Quand une espèce est-elle rare? Rabinowitz (1981) a défini 7 classes de rareté pour une espèce en fonction des critères suivants: l'extension géographique, la spécificité de l'habitat et la taille des populations locales. Selon Primack (1998), une espèce est rare si elle répond au moins à l'une des trois caractéristiques suivantes: une aire de distribution très restreinte, un habitat spécifique, des populations de faible effectif.

Au vu de la définition de la rareté, les espèces rares apparaissent comme plus souvent menacées et vulnérables que d'autres espèces. En effet, une espèce spécialiste, adaptée à un

---

<sup>c</sup> Traduit le fait qu'une population a été fondée par un petit nombre d'individus.

milieu particulier, est plus vulnérable à la disparition de son habitat qu'une espèce généraliste qui peut croître dans des environnements variables (Olivieri et Vitalis 2001). Considérons ensuite les espèces dont l'extension géographique est limitée à quelques sites. Si chacun des sites subit des perturbations, elles risquent de disparaître dans un délai assez court.

Comparativement aux autres espèces, les espèces rares ont donc une plus grande probabilité de disparaître lorsque leur habitat est soumis aux activités anthropiques (Schemske *et al.* 1994). Le problème réside dans la pression humaine qui restreint les milieux favorables aux espèces spécialistes et rares (Olivieri et Vitalis 2001).

Néanmoins, les espèces rares et/ou endémiques ne sont pas forcément toutes menacées de disparition. Les prédictions (diminution de la taille des populations et la perturbation de la métapopulation) mentionnées dans le chapitre précédent concernent les espèces menacées par la fragmentation et qui font face à un rapide déclin de la taille de leur population. Cependant, une distribution fragmentée en petites populations peut être une caractéristique propre de l'espèce et ne pas refléter des changements récents (Leimu et Mutikainen 2005, Wolf et Harrison 2001). Ces espèces sont la plupart du temps parfaitement adaptées à leur milieu (Begon *et al.* 1996, Wolf et Harrison 2001). Les effets de la dépression de consanguinité peuvent être plus faibles chez ces espèces car l'expression des allèles délétères a pu être purgée par la sélection au cours du temps (Byers et Waller 1999, Leimu et Mutikainen 2005) et prendre plus de temps pour se manifester (Wolf et Harrison 2001). Les conséquences des activités anthropiques sur ces espèces peuvent donc être différentes mais peu d'études sont disponibles pour tester cette hypothèse (Wolf et Harrison 2001).

## **1.2 La biologie de la conservation**

### *1.2.1 Ecogéographie des espèces*

Avant de mettre en place toute stratégie de conservation pour une espèce, il apparaît primordial de récolter des données de base sur l'espèce. Selon Maxted (1999), l'étude écogéographique implique la collection de données les plus complètes possibles sur l'écologie, la répartition géographique et la taxonomie de l'espèce à partir de la littérature, des spécimens d'herbiers et des collections. Toujours selon Maxted (1999), ces études constituent une composante essentielle de n'importe quel programme de conservation. Pour des espèces rares et peu connues (de Lange et Norton 2004) des études de terrain sont nécessaires. Dinsdale *et al.* (1997), de Lange et Norton (2004) et Debussche *et al.* (1996) précisent que la conservation d'une espèce rare nécessite premièrement l'investigation de sa biogéographie



incluant la distribution de l'espèce (sa répartition géographique), le nombre de populations dans la zone de conservation visée avec leur localisation précise et la taille de ces populations (nombre d'individus, densité, surface des populations). Ils précisent ensuite que des données sur l'autoécologie (amplitude écologique) de l'espèce et sur son habitat sont aussi des plus pertinentes (Debussche *et al.* 1996): l'espèce se limite-t-elle à des milieux particuliers (par exemple conditions pédologiques), quels sont ses exigences par rapport à des paramètres environnementaux (lumière, humidité, paramètres édaphiques comme le pH), dans quel type de végétation et avec quelles autres espèces se développe-t-elle ? Le but est de déterminer les facteurs environnementaux limitant sa distribution.

Ces études permettent de préciser l'état de rareté de l'espèce ainsi que les menaces liées aux activités humaines passées et présentes qui pèsent sur celle-ci. En outre, elles donnent de précieuses informations sur l'état de conservation des populations.

### 1.2.2 Démographie et succès reproducteur

Les études démographiques sont très utiles pour l'évaluation de la viabilité des populations d'une espèce (Lande 1988, Oostermeijer *et al.* 2003). Ces études démographiques sont considérées comme plus importantes que les études génétiques pour la conservation des populations à court terme. Les études de démographie sont essentielles pour une meilleure compréhension de la dynamique des populations car elles peuvent révéler les stades critiques actuels dans le cycle de vie de l'espèce (Fig. 1.1) et permettre des prédictions sur le développement futur des populations (Schemske *et al.* 1994, Oostermeijer *et al.* 2003). En effet, la diminution du succès de certaines étapes critiques du développement d'une plante peut affecter le recrutement<sup>d</sup> de celle-ci, de nombreuses générations avant que les effets génétiques dus aux petites populations ne se manifestent, plus particulièrement pour des espèces à longue durée de vie (Lande 1988, Ouborg et Van Treuren 1995, Morgan 1998). L'identification des stades du cycle de vie qui posent problème peut grandement aider dans la mise en place de stratégie de conservation. Elle permet de cibler les mesures sur les stades les plus critiques et permet de définir l'habitat optimum (c'est-à-dire celui pour lequel les stades critiques sont le moins perturbés) pour la conservation et la survie de l'espèce. Néanmoins, des études démographiques complètes qui débouchent notamment sur des modélisations de la survie des populations sur le long terme demandent beaucoup d'efforts, de temps et d'investissements, d'autant plus si l'on veut étudier un maximum d'éléments du cycle de vie

---

<sup>d</sup> Recrutement: établissement, au sein d'une population, de nouveaux individus issus de la reproduction ou de l'immigration.

(Fig. 1.1) et les mettre en relation avec la variation de l'habitat, la stochasticité environnementale ou les mesures de gestion. Par rapport à la menace qui pèse sur certaines espèces rares et l'urgence de leur conservation, ce type d'étude est trop long. Dans ce cadre, des études peuvent être ciblées sur certains points clés du cycle de l'espèce comme le succès reproducteur, la relation de la plante avec les pollinisateurs ou la banque de graines. Ces études peuvent être réalisées à plusieurs échelles spatiales. Ainsi, quelques paramètres globaux de succès reproducteur (= "fitness"<sup>e</sup>) peuvent être étudiés sur un nombre important de populations, étant donné qu'il est attendu une relation positive entre la "fitness" d'une espèce et la taille de ses populations (Reed et Frankham 2003). Les études de "fitness" sont assez courantes sur les espèces rares (ex. Hensen *et al.* 2005, Pluess et Stocklin 2004a, Leimu et Mutikainen 2005). Un suivi plus précis de paramètres du succès reproducteur peut également être étudié sur un nombre limité de populations mais mis en relation avec l'habitat, la densité de l'espèce et la variation dans le temps au sein des populations. En effet, le succès reproducteur d'une espèce (surtout les espèces allogames) est influencé par sa densité à travers l'effet Allee (Lande 1988, Roll *et al.* 1997) affectant finalement le taux de fructification et la production de graines (Sih et Baltus 1987, Oostermeijer *et al.* 2003). D'autres processus, comme la compétition (Sih et Baltus 1987) ou la taille des fleurs (Mustajärvi *et al.* 2001), peuvent néanmoins modifier cette hypothèse générale. Enfin, l'évaluation de la banque de graines de l'espèce est également un point très intéressant dans la mise en place de stratégies (Warr *et al.* 1993, Schemske *et al.* 1994) notamment pour la restauration.

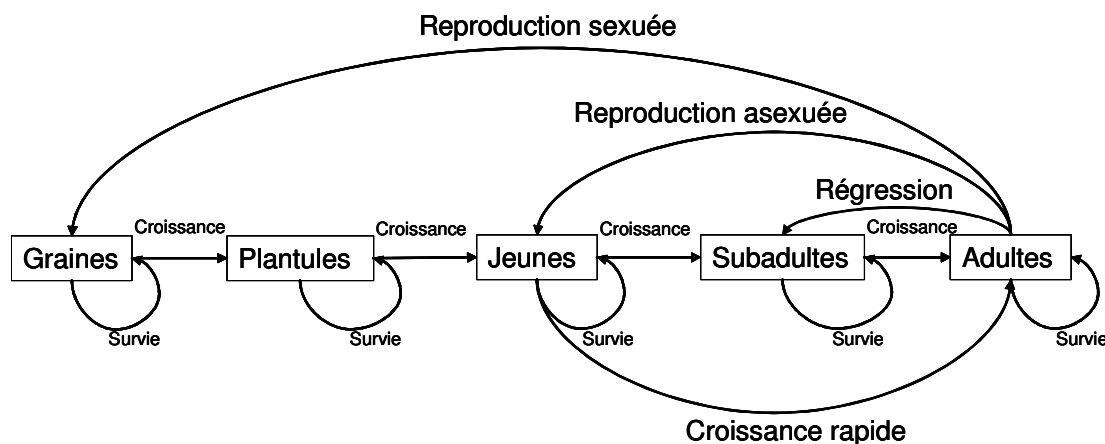


Fig. 1.1: Graphique des différentes étapes du cycle de vie d'une plante (tiré de Schemske *et al.* 1994).

<sup>e</sup> Le terme "fitness" se traduit par valeur adaptative ou sélective c'est-à-dire le nombre de descendants viables et fertiles à la génération suivante que produit en moyenne chaque individu. En biologie de la conservation, cette notion est associée directement au succès ou performance de certains éléments du cycle reproducteur comme par exemple la production de graines ou le taux de germination (Reed 2005).

### 1.2.3 *Les études génétiques, une aide à la gestion des plantes rares ?*

Comme déjà précisé, des effets génétiques aléatoires peuvent altérer la viabilité des populations d'une espèce par la perte de diversité génétique et par la dérive génétique. Les études de la variabilité génétique sont donc devenues essentielles dans la mise au point de stratégies de conservation (Nybom et Bartish 2000). Elles permettent en effet d'évaluer, à travers la diversité génétique, le potentiel évolutif de l'espèce mais aussi de fournir des informations pertinentes sur la biologie de l'espèce et sur les événements passés comme des événements de colonisation, les flux de gènes. D'ailleurs, la variation génétique est un des trois niveaux de conservation recommandés par l'IUCN (Reed et Frankham 2003).

L'étude des niveaux et de la distribution de la variabilité génétique chez les plantes rares permet de mieux comprendre la dynamique, l'adaptation et l'évolution des populations (Lande 1988, Bussell 1999, Zawko *et al.* 2001). Cette partition de la variation génétique résulte de processus dynamiques de flux de gènes, de sélection, de consanguinité, de dérive génétique et de mutation (Bartish *et al.* 1999, Fischer *et al.* 2000, Peterson *et al.* 2002). Par conséquent, le système reproducteur, la dispersion des graines, la forme de vie et la distribution géographique sont fortement associés à la variation génétique totale et à sa partition inter- et intra-population (Gugerli *et al.* 1999, Fischer *et al.* 2000, Nybom et Bartish 2000, Sales *et al.* 2001.). Notamment, les espèces allogames présentent communément une diversité génétique élevée et une faible différenciation de leurs populations par rapport aux espèces autogames ou clonales (Fischer *et al.* 2000, Zawko *et al.* 2001). Les analyses génétiques fournissent également des indications sur l'historique des colonisations de l'espèce et de ses populations (Leimu et Mutikainen 2005).

Beaucoup de plantes rares possèdent une variabilité génétique réduite (par rapport au taxon répandu) et sont souvent différenciées en populations génétiques uniques bien adaptées aux conditions locales pour croître et se reproduire (forte diversité génétique inter-populations) (Fischer *et al.* 2000, Zawko *et al.* 2001). D'autres plantes rares montrent une forte diversité à l'intérieur des populations toujours associée à une forte différenciation entre populations (Zawko *et al.* 2001).

L'établissement de stratégies de conservation nécessite la quantification de la variabilité génétique pour optimiser la conservation de la diversité de l'espèce (Zawko *et al.* 2001) ainsi que le choix des populations à conserver pour maximiser la variation génétique de l'espèce. En général, dans le choix des populations à conserver, celles qui présentent la plus grande diversité génétique devraient avoir la plus haute priorité pour maintenir le potentiel

évolutif de l'espèce (Zawko *et al.* 2001). Mais ce n'est pas toujours le cas. Notamment, si l'espèce présente une forte différenciation entre ses populations, la conservation de quelques grandes populations ne suffit pas pour conserver la diversité de l'espèce. Les petites populations renferment, alors, un potentiel génétique différent et doivent être conservées. De même, pour les plantes rares allogames, les analyses génétiques permettent de conserver le maximum de génotypes différents afin d'éviter les effets de la dépression de consanguinité.

Dans le cadre de la biologie de la conservation, l'étude de la répartition spatiale de la variation génétique au sein des populations permet également d'améliorer les stratégies de conservation et de gestion (Torres *et al.* 2003a). Notamment, les informations apportées permettent d'améliorer les méthodes d'échantillonnage dans le cadre de récolte de graines pour la conservation ex-situ ou des échanges de matériel entre sites. Il en est de même, pour la détermination de la surface minimale d'une population à préserver par exemple si l'entièreté de la population ne peut être conservée. Ces études permettent également d'améliorer les connaissances sur la biologie de l'espèce notamment son système reproducteur, la reproduction végétative ainsi que la limitation à la dispersion de gènes via les graines ou le pollen (Escudero *et al.* 2003).

Les premières études ont été menées à partir de marqueurs du type allozyme dans les années 1970 (Bartish *et al.* 1999). Mais ce type de marqueurs ne fournit que peu de polymorphisme. C'est pourquoi, les marqueurs moléculaires basés sur le principe général de la PCR ont pris le dessus et sont actuellement largement utilisés pour les études de la diversité génétique. La technique PCR, Polymerase Chain Reaction, a été créée en 1985 par Saiki *et al.* Elle est devenue la base de nombreux marqueurs moléculaires. Son principe est relativement simple et est basé sur une amplification enzymatique de l'ADN (Hartl 2000). L'amplification de l'ADN s'effectue par une série de cycles de dénaturation de l'ADN à haute température et de re-naturation avec une élongation de nouveaux brins d'ADN pendant la phase de dénaturation. Parmi les techniques utilisant la PCR, la RAPD a été largement utilisée sur des plantes rares car elle est facile à mettre au point et rapide, demande peu de matériel végétal, ne demande pas de connaissance préalable de séquences ADN de l'espèce et a une haute résolution (Fischer *et al.* 2000, Nybom et Bartish 2000). Ses principales limites sont son manque de répétabilité, sa sensibilité aux conditions de réaction et son caractère dominant. Ces désavantages peuvent être surmontés par des manipulations rigoureuses et uniformes, l'inclusion de contrôles et de répétitions dans ces manipulations et par l'utilisation de programmes adaptés à son caractère dominant (Hadrys *et al.* 1992, Lynch and Milligan 1994). La technique RAPD est une des méthodes les plus commodes pour identifier le

polymorphisme génétique (diversité génétique et structure génétique des populations) d'organismes vivants, principalement des espèces rares (Hartl 2000). Elle a été développée de manière indépendante en 1990 par Williams *et al.* et Welsh et McClelland. Elle utilise le principe général de la PCR avec des amorces de petites tailles (10bp) choisies arbitrairement qui amplifient de manière aléatoire l'ADN génomique (Karp *et al.* 1998, Hartl 2000).

### 1.3 Le contexte des milieux calaminaires en Belgique

#### 1.3.1 Les sites calaminaires: généralités, origines et situation géographique

Les sites calaminaires sont des sites à haute teneur en métaux lourds<sup>f</sup> (Zinc et Plomb essentiellement) dans le sol (Duvigneaud *et al.* 1979, Duvigneaud et Saintenoy-Simon 1998). Cette désignation vient de Calamine, nom donné à un minerai de Zinc souvent composé de deux minéraux: un carbonate de zinc ( $ZnCO_3$ ) et un silicate hydraté de zinc ( $Zn_4(OH)_2.Si_2O_7$ ) résultant principalement de l'altération de la Blende (Pahaut 1988). Ce minerai est souvent associé à la galène (PbS), la blende (ZnS) et parfois la pyrite ( $FeS_2$ ) (Auquier 1964, Leprince et Ertz 2003). Il s'applique par extension à tous les milieux renfermant des teneurs élevées en Zinc et en autres métaux lourds (Pb, Cd, Cu).

Les sites calaminaires présentent des caractéristiques particulières: une toxicité du substrat en raison de la teneur anormalement élevée en ions métalliques toxiques, une relative xéricité (milieu ouvert et sol poreux) et une pauvreté en nutriments (surtout en azote et phosphore assimilables) (Jacquemart 1958, Simon 1979). D'après Duvigneaud et Saintenoy-Simon (1996) et Duvigneaud *et al.* (1993), les sites calaminaires (souvent désignés sous le vocable de "halde calaminaire"<sup>g</sup>) peuvent être classés en quatre grands types selon leur origine:

- 1) Les sites calaminaires primaires (Fig. 1.2a): il s'agit des affleurements en place, des filons ou amas de minerais. Indépendamment des activités humaines, des concentrations excessives de certains métaux lourds dans les sols résultent de la minéralisation naturelle, due à la présence de minerais non perturbés, proches de la surface (Ernst 1990).
- 2) Les sites calaminaires secondaires (Fig. 1.2b): sont des déblais résultant de l'exploitation plus ou moins ancienne, sur place, des mines et des excavations de surface. En Europe

---

<sup>f</sup> On appelle métaux lourds les éléments métalliques naturels caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$  ou parfois  $4 \text{ g/cm}^3$  (Seaward et Richardson 1990). Ils sont aussi parfois désignés par l'appellation "éléments traces métalliques". A des concentrations normales certains sont utiles voire indispensables aux végétaux mais ils deviennent tous toxiques à partir d'un certain seuil.

<sup>g</sup> Le mot "halde" est un terme local d'origine germanique, désignant la station où ont été amassés les résidus provenant de l'exploitation ou de la transformation des minerais de Zinc.

centrale, se trouvent des sols riches en métaux lourds qui ont été exploités dès l'époque médiévale par des mines de surface (Hildebrandt *et al.* 1999), on peut même remonter jusqu'à l'époque romaine (Lefèbvre Comm. Perso., Leprince et Ertz 2003).

- 3) Un autre type de sites calaminaires secondaires (Fig. 1.2c) est formé de cendrées et scories... résultant de l'activité des usines qui ont traité le minerai pour en extraire le métal. Il arrive aussi qu'à la faveur des crues, des zones alluviales soient enrichies en sels de métaux lourds provenant des sites situés plus en amont.
- 4) Les sites calaminaires tertiaires (Fig. 1.2d): il s'agit de sites résultant de pollutions atmosphériques. L'exploitation industrielle des minerais entraîne l'émission et la dispersion dans l'atmosphère de particules métalliques et de fumées riches en oxydes acides (SO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, ...) aux abords des usines. Ces fumées et ces retombées atmosphériques transforment le tapis végétal initial en agissant directement sur les organes des plantes et en contaminant le sol. Elles constituent à la longue des milieux particuliers empoisonnés (Fagot 1993). Ces contaminations peuvent être observées dans une zone de quelques kilomètres autour de la source de pollution en fonction des vents dominants. L'impact des émissions est dès lors marqué car la végétation environnante n'a jamais été confrontée à des surplus de métaux lourds (Ernst 1990).

Certains sites possèdent donc un sol naturellement métallifère mais une grande majorité d'entre eux sont d'origine anthropique, que leur substrat soit d'origine minière ou que le sol ait subi des contaminations métalliques par voie atmosphérique (Simon 1978). De notre point de vue, nous distinguerons deux grands types de sites: les sites d'origine ancienne (les sites primaires et les sites secondaires résultant d'une exploitation sur place) et les sites d'origine récente (les sites tertiaires et les sites secondaires de dépôts des usines).

Les sites calaminaires en Europe sont situés le long de deux ceintures métallogéniques principales. La première traverse les Pyrénées et les Alpes. La seconde débute en Grèce, et prend fin dans la région située entre Liège et Aix-la-Chapelle, en passant par la Silésie. En Belgique, les sites anciens se situent donc tous dans l'est de la province de Liège (entre Liège et Aix-La-Chapelle). Au niveau géologique, ces sites anciens occupent le centre de terrains carbonifères et dévoniens qui séparent les bassins houillers du Pays de Herve et d'Aix-la-Chapelle (Jacquemart 1958). Le substratum de la région est formé de roches calcaires paléozoïques fortement plissées lors de l'orogénèse hercynienne et perturbées localement par des failles, là où les calcaires offraient une trop forte résistance (Jortay 1984). Les formations métallifères se trouvent au contact de calcaires ou de dolomies.





Fig. 1.2: Photographies de sites calaminaires a) site primaire de Kelmis b) site secondaire en place de Theux. Ces deux sites sont considérés comme anciens. c) site secondaire de déblais à Angleur d) site tertiaire de Prayon. Ces deux sites sont considérés comme récents.

Enfin, à partir de la seconde moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle, d'importantes industries du zinc se sont développées à l'écart des zones naturellement minéralisées notamment dans la vallée de la Meuse (entre Liège et Namur) et dans la vallée de la Vesdre (Liège, Prayon, Chaudfontaine). De vastes terrils, remblais et zones polluées de manière atmosphérique en témoignent (Lambinon et Auquier 1964). La flore calaminaire est donc apparue sur un certain nombre d'autres sites, principalement à Liège et dans la vallée de la Vesdre. En Belgique, les

sites calaminaires sont donc des habitats ponctuels isolés spatialement les uns des autres. En 2003, Graitson recense 33 sites calaminaires en Belgique occupant 268 hectares.

### 1.3.2 La flore calaminaire

Comme nous l'avons mentionné, les sites calaminaires sont des milieux particuliers. La flore qui s'y établit est soumise à des pressions environnementales importantes pour ne pas dire impropres à la vie. Selon Brown (1994), c'est surtout le Zinc qui exerce une pression de sélection sévère sur les plantes. Partant des constatations sur la toxicité des métaux lourds, on pourrait s'attendre à une absence totale de végétation sur les sols riches en ces éléments. Au contraire, l'observation fait apparaître l'existence d'une flore spécialisée sur ces biotopes (Maquinay et Ramaut 1960). Les métaux lourds sont responsables, sur le plan écologique, de la formation de groupements végétaux particuliers de type pelouses naturelles et semi-naturelles (Maquinay et Ramaut 1960, Auquier 1964). Étant donné leur dynamique végétale extrêmement lente, les pelouses calaminaires sont des formations allant de la pelouse ouverte à la pelouse dense fermée.

On reconnaît plusieurs classifications à cette flore. En 1958, Duvigneaud propose un système de classement basé sur la flore cuprifère adapté pour la flore métallicole. En 1964, Lambinon et Auquier modifient cette classification. Plus récemment, Lefèbre (Leteinturier 2002) a proposé une autre classification où il distingue trois catégories:

- 1) Métallophytes indifférents: ce sont des espèces qui, dans une région donnée, se rencontrent à la fois sur des sites normaux et sur des sites métallifères.
  - a. Electifs: elles sont plus abondantes sur sites intoxiqués.
  - b. Non-electifs: elles ont la même abondance sur sites métallifères et ailleurs.
- 2) Métallophytes locaux: ce sont des espèces qui, dans une région donnée, se rencontrent uniquement sur sites métallifères alors qu'ailleurs, ils sont sur sites normaux. Ces espèces peuvent être des reliques d'espèces autrefois plus largement répandues. Étant éloignées géographiquement de leurs congénères, elles ont pu se différencier légèrement de celles-ci (variétés différentes).
- 3) Métallophytes vrais: espèces ou sous-espèces qui n'existent que sur sites métallifères. Certaines peuvent se trouver sur de nombreux sites métallifères, d'autres sur un ou quelques sites. Les métallophytes vrais sont en fait des endémiques métallicoles.

Globalement, on pourrait, en tenant compte uniquement de la tolérance aux métaux lourds, définir plus simplement les classes d'espèces suivantes (inspiré de Pollard et Baker 1997, Whiting *et al.* 2002) :



- les métallobes: espèces à tolérance nulle, qui ne peuvent pas se développer sur sites métallifères. Des plantules de l'espèce peuvent y apparaître, mais elles ne perdurent pas longtemps. Ces plantes évitent les sols riches en métaux lourds et y meurent si elles tentent de s'y fixer
- les pseudométallophytes: espèces qui peuvent croître sur sites métallifères, sous forme d'écotypes<sup>h</sup> ou non, comme sur sites normaux. L'écotype peut paraître, au moment de l'observation bien différencié et donc adapté à son nouvel environnement, ou non.
- les métallobes: espèces endémiques des sites métallifères (Pollard et Baker 1997).

Le nombre de métallobes présents en Europe occidentale est extrêmement réduit. En Région wallonne, seuls sept plantes vasculaires, un lichen et une bryophyte sont observés comme métallobes. Leur taxonomie est complexe et régulièrement modifiée. La nomenclature utilisée est celle reprise dans la Flore de Belgique (Lambinon *et al.* 2004). Les principales métallobes en Belgique Duvigneaud et Saintenoy-Simon 1998, Graitson 2003) sont *Viola calaminaria* (Gingins) Lej. (Fig. 1.3b), *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminare* (Lej.) Dvorakova (Fig. 1.3c), *Armeria maritima* subsp. *halleri* (Wallr.) Rothm. (Fig. 1.3a), *Silene vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *humilis* R. Schubert, *Festuca ovina* subsp. *guestfalica* (Boenningh. Ex Reichenb.) K. Richt., *Cochlearia pyrenaica* DC., *Minuartia verna* (L.) Hiern var. *hercynica* (Willk.) Friedrich (Fig. 1.3d), *Stereocaulon nanodes* Tuck. (lichen), *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth. (Bryophyte). Le nombre de pseudométallophytes est plus étendu. Les principaux taxons répandus sur les terrains calaminaires en Région wallonne sont *Agrostis capillaris* L., *Festuca* div. sp., *Rumex acetosa* L., *Campanula rotundifolia* L., *Arrhenaterum elatius* (L.) Beauv. Ex J. et C. Presl, *Molinia caerulea* (L.) Moench et *Calamagrostis epigejos* (L.) Roth pour les plantes vasculaires. On note aussi plusieurs bryophytes et de nombreux lichens appartenant principalement aux genres *Cladonia* et *Stereocaulon*.

Sur le plan phytosociologique, les associations des différents terrains calaminaires belges et européens ont fait l'objet de nombreux travaux. On signalera la synthèse récente effectuée par Brown (2001). *Violetum calaminariae* est la principale association des pelouses calaminaires belges. Cette association est endémique à la région Liège – Aachen – Stolberg. L'association est caractérisée principalement par la présence de *Viola calaminaria* (espèce

---

<sup>h</sup> Dans le domaine de la génétique, le terme écotype désigne une population locale d'une espèce qui se caractérise par l'acquisition génétique de modifications sélectionnées par des conditions écologiques particulières (Fischesser et Dupuis-Tate (1996). Le guide illustré de l'écologie. Editions de la Martinière, Paris, 319 p., cité par : Leteinturier (2002)).

caractéristique) en association notamment avec *Armeria maritima* subsp. *halleri* (Gazon de l'Olympe calaminaire), *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminariae* (Tabouret calaminaire), *Festuca ovina* subsp. *guestfalica* et *Silene vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *humilis* (Silène calaminaire).



Fig. 1.3: Photographies de a) *Armeria maritima* subsp. *halleri*, b) *Viola calaminaria*, c) *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminariae*, d) *Minuartia verna* var. *hercynica*

Trois sous-associations peuvent être distinguées (Brown 2001) sur base de la toxicité en zinc et en autres métaux, du pH et de la teneur en calcium dans les sols où on les rencontre: le *Violetum calaminariae typicum* (pelouses à *Viola calaminaria*), le *Violetum calaminariae callunetosum* (landes calaminaires) et le *Violetum calaminariae achilletesum* (pelouses basiclines à *Viola calaminaria*).

Au niveau de l'origine de cette flore, la majorité des métalphytes présentent un caractère montagnard ou boréo-montagnard net, ce qui laisse à penser que leur installation dans nos régions remonte à une époque où les conditions climatiques étaient des conditions de

steppe froide périglaciaire (Auquier 1964). Leur origine semble donc remonter à la dernière glaciation du Quaternaire, il y a 10 000 à 15 000 ans (Ernst 1990). Lors du réchauffement climatique, les sites calaminaires seraient apparus dès lors comme des refuges pour certaines de ces espèces de milieu ouvert.

### 1.3.3 Intérêts conservatoires des milieux calaminaires

La flore calaminaire présente un intérêt scientifique particulier tant sur le plan fondamental que sur le plan appliqué. En effet, les problèmes posés par une telle flore sont multiples. Sur le plan fondamental, ils se placent à la fois sur les plans taxonomique (aspects morphologiques, génétiques,...), écologique (biodiversité, écotoxicologique), physiologique... Au niveau appliqué, cette flore est étudiée pour les problématiques de phytoremédiation (Graitson 2003).

Les taxons végétaux calaminaires présentent un intérêt scientifique élevé pour la compréhension des phénomènes de micro-évolution pouvant mener à des processus de spéciation. Cette évolution résulte de deux facteurs: d'une part, la présence de métaux lourds dans le sol induit une pression de sélection sévère et, d'autre part, les habitats riches en métaux lourds peuvent être considérés comme des îles écologiques au sein desquelles les effets de fondation et l'isolement géographique pourraient être des facteurs importants de différenciation (Lefèbre et Vernet 1990, Mengoni *et al.* 2000, Macnair 2002). La différenciation d'écotypes pourrait se faire très rapidement selon Wu et Bradshaw (1972).

Ensuite, et plus particulièrement dans le cadre de cette étude, la flore calaminaire présente un intérêt conservatoire élevé. En effet, cette flore est caractérisée par un taux d'endémisme élevé et se retrouve dans des stations qui peuvent être considérées comme relictuelles c'est-à-dire isolées depuis de longues périodes. Les taxons retrouvés sont souvent rares. Dans ce cadre, les pelouses calaminaires sont reprises dans l'Annexe 1 de la Directive 92/43/CE Faune-Flore-Habitat (modifiée par la directive 97/62/CE), sous l'appellation "Pelouses calaminaires du *Violetalia calaminariae*" (code habitat 6130). Les sites sont souvent repris comme Réserves naturelles ou sites Natura 2000 et possèdent donc à ce titre un statut légal de protection (notamment par le décret wallon du 6 décembre 2001 relatif à la conservation des sites Natura 2000). Un certain nombre de métallophytes dont *Viola calaminaria* sont des plantes protégées au niveau de la législation wallonne (décret 2001, Annexe 6b). Outre la flore, les milieux calaminaires abritent d'autres espèces plus ou moins menacées. C'est particulièrement le cas pour l'entomofaune (exemple: *Issoria lathonia* L. le petit nacré, Nymphalidae; Ertz 1998, Ertz et Hermanns 1998).

Sur le plan appliqué, les techniques de dépollution par les plantes ou techniques de phytoremédiation, connaissent un intérêt croissant. Elles sont peu coûteuses en comparaison des traitements physico-chimiques. En outre elles permettraient de décontaminer un sol avec une perturbation minimale de l'environnement. Deux grandes techniques peuvent être mentionnées. Premièrement, la phytoextraction est une méthode de phytodécontamination qui utilise la capacité qu'ont certains végétaux à absorber les polluants dans leurs parties aériennes. Les végétaux sont alors fauchés puis brûlés. Les cendres enrichies en métaux lourds sont stockées ou bien, les métaux, s'ils ont une valeur économique suffisante, sont réinjectés dans le cycle de production des métaux (Dubourgrier *et al.* 2001, Leteinturier 2002). Mais les plantes potentiellement candidates à la phytoextraction sont rares car elles doivent être hyperaccumulatrices<sup>1</sup> de Zinc ou d'autres métaux lourds et être en plus une espèce à forte biomasse. Or, la plupart des hyperaccumulatrices décrites à ce jour sont des espèces à faible biomasse. Deuxièmement, la phytostabilisation est une technique qui vise à fixer les métaux avec des plantes sur un site particulier. Elle empêche l'érosion éolienne, le lessivage et l'érosion du sol et donc la fuite des métaux dans l'eau. Cette technique est employée dans le cas de sites extrêmement pollués où les autres techniques ne sont pas envisageables car elles sont soit trop coûteuses, soit trop longues en temps. Ces sites peuvent alors servir de terrains expérimentaux pour les chercheurs et de zones conservatoires pour cette flore particulière (Dubourgrier *et al.* 2001).

Finalement, de nombreux auteurs recommandent également la conservation de cette flore et des milieux qui l'hébergent en raison de leur valeur patrimoniale élevée. Les sites calaminaires sont le témoin d'une activité industrielle passée (Brevers 2003).

Les sites calaminaires sont aujourd'hui menacés essentiellement par les activités humaines. La principale menace vient de la volonté de réhabilitation de ces sites (Graitson 2003). Ils sont toujours considérés comme des terrains pollués et non comme des lieux à haute valeur conservatoire. Citons notamment le site de Plombières qui a subi un remblayage et un nivellement par des terres extérieures pour le transformer en parc public. D'autres sites sont utilisés comme dépotoirs publics (pneus, matelas,...) par le voisinage, comme matériaux de remblais, ... Il semble prioritaire de développer des stratégies de conservation *in situ* et *ex situ* des taxons endémiques de ces milieux en Région Wallonne.

---

<sup>1</sup> Une plante est hyperaccumulatrice si elle contient une teneur > 10 000 mg de Zn/kg de matière sèche de plante et une teneur > 100 mg de Cd/kg de matière sèche de plante.



## 1.4 L'espèce étudiée: *Viola calaminaria*

### 1.4.1 Classification

La pensée calaminaire (Fig. 1.4) est classée (Lambinon *et al.* 2004) dans la famille des Violaceae, genre *Viola*, sous genre *Melanium*. La famille des Violaceae contient principalement des plantes herbacées. Il s'agit d'une famille subcosmopolite, groupant environ 850 à 900 espèces, réparties en 22 genres. Ces plantes possèdent le plus souvent une inflorescence en forme de grappes ou de fleurs solitaires. Le fruit est une capsule à une loge qui contient plusieurs graines, munies d'une caroncule plus ou moins développée (Blamey et Grey-Wilson 1991, Lambinon *et al.* 2004).

Le genre *Viola* regroupe environ 400 espèces, dont une dizaine en Belgique. Ce genre comporte des plantes annuelles, bisannuelles, vivaces et même quelques arbrisseaux. On y distingue notamment les violettes (sous-genre *Viola*) et les pensées (sous-genre *Melanium*). Les pensées ont quatre pétales dirigés vers le haut, les deux pétales latéraux étant redressés vers les pétales supérieurs. Les violettes ont les deux pétales supérieurs dirigés vers le haut et les deux pétales latéraux étalés à angle droit ou plus ou moins dirigés vers le bas (Lambinon *et al.* 2004).

### 1.4.2 Description botanique et localisation géographique



Fig. 1.4: Photographies de *Viola calaminaria*

D'après les observations, *Viola calaminaria* (Fig. 1.4) appartient au type pensée. C'est une plante pérenne, hémicryptophyte, à rhizomes, qui fleurit principalement de mai à juillet. Les stipules des feuilles moyennes sont subpalmées-digitées, multifides, à lobe médian dépassant peu les autres lobes. L'éperon est long de 5 à 7 millimètres, assez mince et deux à trois fois aussi long que les appendices du calice (Lambinon *et al.* 2004). La corolle est généralement jaune (Fig. 1.4) bien que les pétales supérieurs, voire tous les pétales, soient parfois d'un bleu clair à pourpre (Fig. 1.6). Les plantes sont généralement robustes, sans pubescence grisâtre, et mesurent entre 8 et 40 cm. Le diamètre longitudinal de la corolle (suivant l'axe de symétrie bilatérale) mesure entre 15 et 25 millimètres. Les pétales sont nettement plus longs que les sépales. *V. calaminaria* possède un style dilaté brusquement en tête sphérique, non terminé par un crochet (Lambinon *et al.* 2004). Le fruit est une capsule à trois loges qui explosent à maturité. La dispersion peut soit se faire de proche en proche par les graines, soit de manière végétative par les rhizomes (Lambinon *et al.* 2004, Beckers 1997). Par comparaison avec des espèces apparentées (*V. tricolor* ou *V. lutea*) (Krahulcova *et al.* 1996), *V. calaminaria* est présumée majoritairement allogame mais un peu d'autogamie ou de géitonogamie<sup>j</sup> est néanmoins possible. *V. calaminaria* possède également une banque de graines importante, permante à court terme (environ 900 graines/m<sup>2</sup>, Bizoux non publiés).

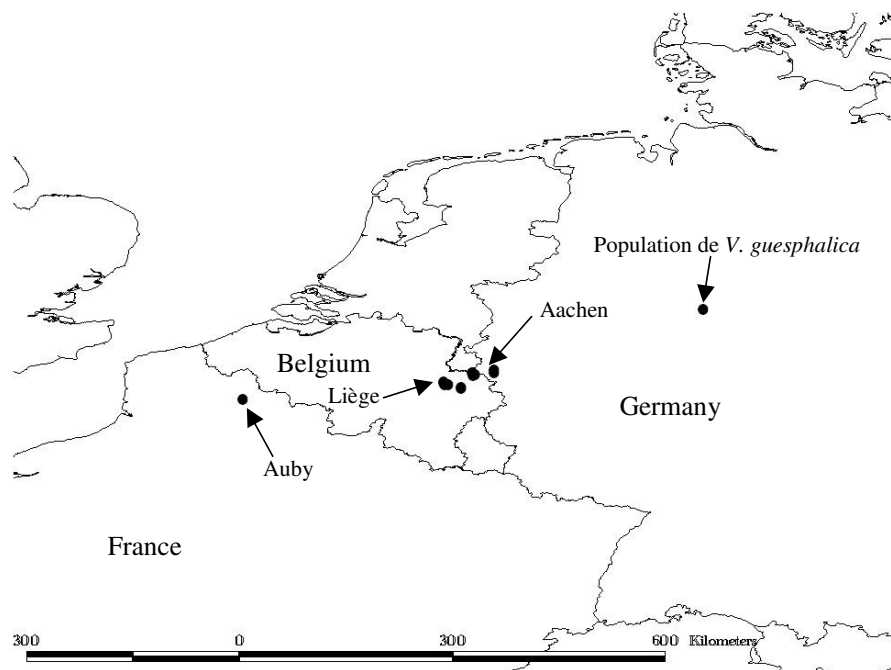


Fig. 1.5: Carte de répartition de *V. calaminaria*. Les points représentent les zones géographiques où des populations de *V. calaminaria* sont recensées.

<sup>j</sup> Reproduction sexuée entre fleurs d'un même clone.

La pensée calaminaire est considérée par les naturalistes belges comme une espèce endémique des sols contaminés en zinc de la région Stolberg-Aix-la-Chapelle-Liège (Fig. 1.5) où elle peut constituer des populations importantes. En Belgique, elle est présente dans le district mosan où elle couvre les environs de Liège, les bassins de la Vesdre et de la Gueule. En Allemagne, elle se trouve dans la région d'Aix-La-Chapelle et Stolberg (Lambinon *et al.* 2004). Elle est également présente dans le sud-est du Limbourg néerlandais. Elle est d'ailleurs présentée comme l'indicateur de zinc par excellence (Ernst 1990). La pensée calaminaire est un zincophyte obligatoire et se comporte comme si elle avait un besoin métabolique d'une concentration minimale en zinc même si elle n'apparaît pas comme une hyperaccumulatrice (Jedrzejczyk *et al.* 2002). Une hypothèse a été formulée selon laquelle la présence de la pensée calaminaire dans ces milieux pourrait être liée à la colonisation de leurs racines par des champignons mycorrhiziens qui modéreraient la toxicité des métaux (Hildebrandt *et al.* 1999). Beaucoup de stations de *Viola calaminaria* ne sont apparues que depuis les années 1970. Il semblerait qu'il y ait eu une expansion manifeste de la pensée calaminaire depuis cette époque (Jortay 1984) sur une série de sites récents. Récemment, par contre de nombreux sites ont été partiellement ou totalement détruits par réhabilitation (Brown 2001, Graitson 2003). D'autres sites sont menacés par des projets de réhabilitation futurs. Le recensement exact du nombre de populations est donc primordial.



Fig. 1.6: Morphotypes bleu-mauve de *Viola calaminaria* à Kelmis (photo: Daïnou Kasso)

Pour être complet, il faut préciser qu'une pensée est également présente sur un site calaminaire du nord de la France (Auby; Tonin 2001). Cette pensée ressemble fortement à notre pensée calaminaire même si quelques individus présentent des morphologies proches de la pensée de jardin (observation personnelle). Dans le centre de l'Allemagne (Blankerode), on retrouve également une autre pensée sur des sites calaminaires. Celle-ci est de couleur violette et est appelée *Viola guestphalica* Nauenb. (Kakes 1977, Ernst 1990). Enfin, en Grande-Bretagne, la pensée croissant sur les sites calaminaires n'est pas différenciée de *Viola lutea*.

### 1.4.3 Problématique de la classification taxonomique

Tout d'abord, il paraît important de rappeler les différentes espèces et sous-espèces apparentées: *Viola tricolor* L. ( $2n = 26$ ), *Viola tricolor* subsp. *subalpina* Gaudin ( $2n = 26$ ), *Viola arvensis* Murray ( $2n = 34$ ), *Viola lutea* Huds. subsp. *lutea* ( $2n = 48$ ), *Viola lutea* Huds. subsp. *sudetica* (Willd.) Nyman ( $2n = 50$ ). Il est important de souligner également que: 1) en Grande-Bretagne, on retrouve une pensée présente indifféremment sur sols normaux et sur sols pollués en métaux lourds et qu'elle est nommée *V. lutea*; 2) *V. arvensis* est apparemment métal sensible (Kakes et Everards 1976); 3) *V. tricolor* est plutôt métal tolérant et il existe en Allemagne et en Pologne, dans des régions géographiques différentes de *V. calaminaria*, des écotypes de *V. tricolor* sur sols pollués en métaux lourds (Hildebrandt *et al.* 2006).

Le premier à avoir décrit et nommé la pensée calaminaire est un botaniste verviétois, A.L.S Lejeune. Dans sa "Flore des environs de Spa" (1811), il la mentionne pour la première fois sous le nom de *V. lutea* Smith. Ensuite, il la désigne par le nom de *V. calaminaria* N.V. *lutea* Fl. dans sa "Revue de la flore des environs de Spa" (1824). L'espèce a donc tout d'abord été considérée comme une variété de *V. lutea* Huds. Nauenburg<sup>k</sup> (1986, cité par: Brown (2001)) pensait également qu'elle devait être considérée comme une sous-espèce de *V. lutea* (*Viola lutea* Huds. subsp. *calaminaria* (Ging.) Nauenb.), étant donné la ressemblance morphologique et le nombre de chromosomes identiques ( $2n = 48$ , Kakes 1979) entre ces deux plantes. Ernst<sup>l</sup> (1974, cité dans Brown 2001) et Heimans (1961) avaient par contre trouvé un nombre de chromosomes de  $2n = 52$ . Ces études cytologiques et morphologiques ont démontré qu'il s'agit en réalité d'un taxon dérivé par polyploïdie de *Viola saxatilis* F.W. Schmidt (syn.: *Viola tricolor* subsp. *subalpina*). *V. calaminaria* en dériverait par doublement du nombre chromosomique (*V. tricolor* subsp. *subalpina*:  $2n = 26$  ; *V. calaminaria*:  $2n = 52$ ) et s'en différencierait par son adaptation aux sols calaminaires (Heimans 1961). Dans la même

<sup>k</sup> Nauenburg J.D. 1986. Untersuchungen zur Variabilität, Ökologie und Systematik der *Viola tricolor*-gruppe in Mitteleuropa. Diss. Math.-Nat. Fachbereich. Univ. Göttingen.

<sup>l</sup> Ernst W. 1974. Schwermetall vegetation der erde. Fischer, Stuttgart.



logique, comme l'espèce peut également être confondue avec les formes jaunes de *V. tricolor* L., la pensée sauvage (Lambinon *et al.* 2004), Ernst (1974, cité par Kakes et Everards 1976) a avancé l'hypothèse que les pensées calaminaires pouvaient s'être développées récemment, c'est-à-dire après la dernière glaciation, à partir de *V. tricolor* même si les deux espèces ont des exigences écologiques différentes (calcium ou type de milieu). D'après Ernst (1974) et Kakes et Everards (1976), il existe deux sous-espèces de *V. calaminaria* en Europe du Nord-Ouest: *Viola calaminaria* subsp. *calaminaria* Lej. et *Viola calaminaria* subsp. *westfalica* (Lej.) Ernst. Kakes et Everards (1976) argumentent en prouvant l'hybridation entre les deux taxons. Pour Nauenburg (1986, cité par Brown 2001), il faudrait plutôt les considérer comme deux taxons distincts: *V. lutea* subsp. *calaminaria* (ou *V. calaminaria*) et *V. guestphalica* Nauenb. ( $2n=52$ ), appartenant plus au complexe de *V. tricolor*. Kakes (1977) a également montré que *V. guestphalica* s'introgresse avec *V. arvensis*. Néanmoins, le comptage du nombre de chromosomes est assez difficile en raison de leur petite taille (1.4-3.4  $\mu\text{m}$ ; Hildebrandt *et al.* 2006) et donc il paraît difficile de trancher sur la base de ces études assez anciennes (Fig. 1.7).

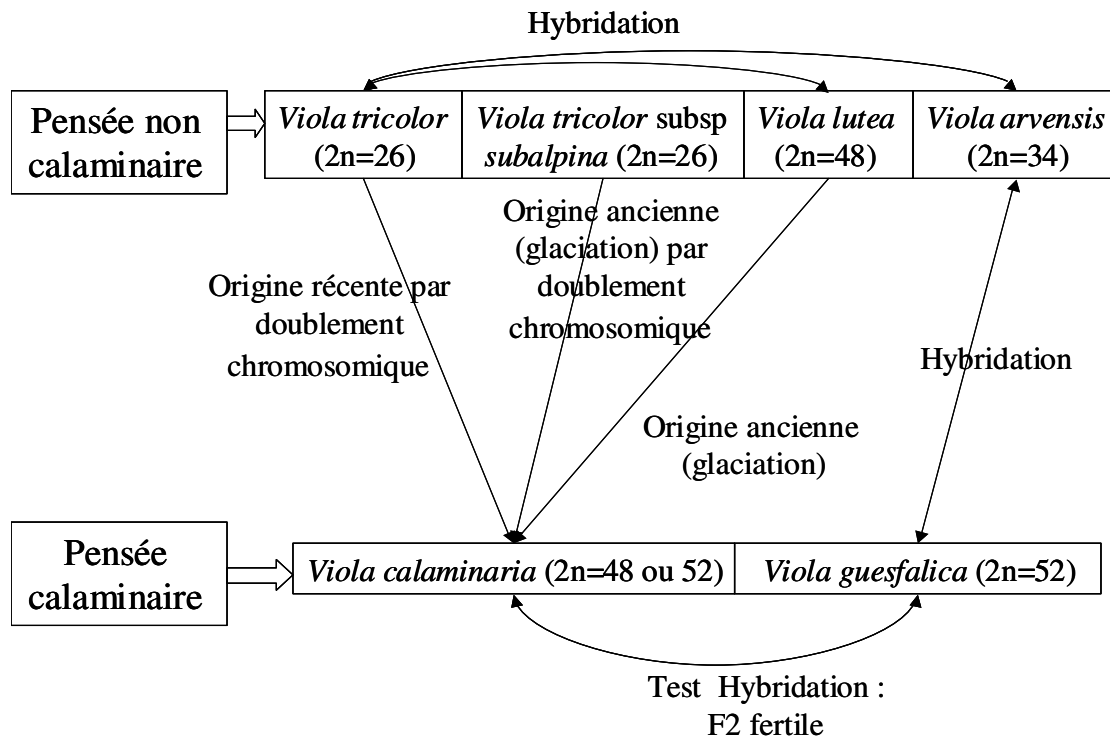


Fig.1.7: Illustration des différentes origines possible de *Viola calaminaria*.

Des investigations plus récentes notamment avec l'aide des techniques moléculaires ont donc été réalisées. En 2003, Rostanski a comparé morphologiquement et sur le nombre de

chromosomes *V. calaminaria* avec *V. guesphalica*, *V. tricolor* et les deux sous-espèces de *V. lutea*. Dans un dendrogramme basé sur les critères morphologiques, ils rapprochent *V. calaminaria* de *V. lutea* dans un même grand groupe séparé du groupe de *V. tricolor* (où on retrouve *V. guesphalica*). Néanmoins, dans le clade *V. lutea*, *V. calaminaria* forme un groupe particulier notamment par la présence d'un pédoncule floral de longueur largement supérieure à *V. lutea*. En fait, le caractère pérenne et la présence de rhizomes sont les facteurs les plus importants de distinction de *V. calaminaria* par rapport aux autres pensées belges (Lambinon *et al.* 2004). Par cette caractéristique, elle se rapproche de *V. lutea* (Flore européenne) comme souligné par Rostanski (2003).

Enfin, récemment, Hildebrandt *et al.* (2006) ont réalisé une étude phylogénique sur base du séquençage d'ITS<sup>m</sup>. Ils ont clairement montré que *V. calaminaria* et *V. guesphalica* se rapprochent de *Viola lutea* subsp. *lutea*. Ils préconisent donc le classement suivant: *Viola lutea* subsp. *calaminaria* et *Viola lutea* subsp. *guesphalica*. Ils soutiennent deux hypothèses pour l'origine des pensées calaminaires. La première est qu'elles dérivent directement de *V. lutea* comme écotypes, par différenciation et adaptation après les glaciations. La seconde est qu'elles dérivent de *V. lutea* avec hybridations avec d'autres pensées comme *V. tricolor*. Pour *V. calaminaria*, la première hypothèse est la plus vraisemblable car 1) les deux espèces sont proches morphologiquement et partagent des biotopes marginaux (sites calaminaires/pelouses d'altitude) 2) les comptages chromosomiques les plus récents les rapprochent ( $2n = 48$ ) 3) les processus reproductifs sont bien stables chez *V. calaminaria* (Kuta, Comm. Perso.) 4) ce type de micro-évolution a été rapportée chez d'autres espèces métallophiles (Ernst 1999). De plus, *V. tricolor* est très peu présente, voire quasi absente, de la région de Liège Aix-la-chapelle et Hildebrandt *et al.* (2006) ajoutent qu'il aurait été étonnant, même si *V. tricolor* avait été présente dans le passé dans la région, que la sélection ait favorisé un hybride avec *V. lutea* plutôt que les écotypes déjà tolérants de *V. tricolor* (qui existe dans d'autres régions d'Allemagne). La présence de *V. lutea* en Grande-Bretagne à la fois sur terrains non pollués et pollués conforte cette hypothèse. D'autre part, Hildebrandt *et al.* 2006 ont également trouvé dans les Vosges sur *V. lutea* des morphotypes jaunes (principal) et quelques morphotypes bleus en patchs (50-100 m) et même des morphotypes intermédiaires. Des phénomènes similaires sont observés sur certains sites belges calaminaires comme Prayon ou même la réserve de la Calamine où des morphotypes bleus sont présents (observation personnelle). Il existe donc un ensemble de preuves et éléments qui montrent le lien entre *V. calaminaria* et

---

<sup>m</sup> Internal Transcribed Spacer

*V. lutea*. En suivant l'avis d'Hildebrandt *et al.* (2006), *V. lutea* a sous doute eu une distribution beaucoup plus large pendant les glaciations à travers l'Europe que maintenant et lors du réchauffement, par manque de compétitivité, elle aurait été repoussée sur des milieux plus marginaux (pelouses d'altitude, sites calaminaires ou pelouses calcaires et acides au Royaume-Uni) où elle s'est maintenue, adaptée et a évolué. La présence des champignons mycorrhiziens favorisant la croissance sur sols pollués à la fois sur *V. lutea* (Angleterre et pelouse alpine) et sur *V. calaminaria* conforte également cette hypothèse (Hildebrandt *et al.* 1999). Cette origine est la plus vraisemblable malgré l'hybridation possible entre *V. lutea* et *V. tricolor* (Krahulcova *et al.* 1996). Pour *V. guesphalica*, aucune des deux hypothèses ne paraît évidente car Kakes (1977) a montré qu'elle s'hybridait avec *V. arvensis* sur le terrain et car Kakes et Everards (1976) ont démontré qu'elle était tétraploïde avec un nombre chromosomique de  $2n = 52$ . De plus, Siuta *et al.* (2005) montrent qu'elle possède un processus reproductif non stable et suggèrent une origine par hybridation pour *V. guesphalica*.

En résumé, quel que soit le niveau taxonomique, espèce, sous-espèce ou simple écotype, *V. calaminaria* représente une évolution particulière par son adaptation au site calaminaire et nécessite de mettre en place des études pour élaborer une stratégie de conservation. Le statut spécifique et le nom *Viola calaminaria* seront conservé dans le présent travail suivant la flore de référence pour la Belgique (Lambinon *et al.* 2004).

## 1.5 Objectifs de l'étude

La mise en place de stratégies de conservation pour une espèce rare nécessite donc l'étude de la biologie des populations. Ces études visent à définir les habitats de l'espèce et son écologie, à étudier les éléments de viabilité des populations locales (paramètres du cycle reproducteur), à évaluer leur connectivité et leur structure génétique ainsi que leur diversité génétique.

Le présent travail a donc pour objectif d'aborder l'écologie de la conservation de *V. calaminaria* à travers deux grands axes de recherche dans le but de dégager les stratégies de conservation et les unités de conservation pour l'espèce en comparant la valeur conservatoire des sites anciens avec celle des sites récents.

Le premier axe de recherche visera à étudier les traits importants de la biologie des populations de l'espèce. Le chapitre 2 présentera une étude écogéographique qui visera au recensement des populations de *Viola calaminaria* et à l'estimation de leur taille. L'étude de l'habitat de l'espèce par relevés floristiques et la mise en relation avec des paramètres édaphiques (teneurs en métaux lourds) seront également réalisées. Le chapitre 3 sera consacré à l'étude de paramètres du cycle reproducteur permettant d'identifier d'éventuels stades critiques (éléments de viabilité des populations locales) pour l'espèce. L'étude de la variation spatiale et temporelle de certains paramètres liés au succès reproducteur sera étudiée, à une échelle géographique restreinte, au sein de différents habitats en relation avec la densité de l'espèce. Deux éléments particuliers du succès reproducteur (nombre de graines/fruit, taux de germination) seront étudiés sur un nombre de populations plus élevé afin d'évaluer l'impact de la taille des populations.

Le deuxième axe abordera la variabilité génétique de *Viola calaminaria* à deux échelles. Le chapitre 4 sera consacré à l'évaluation, sur l'ensemble de l'aire de distribution de *Viola calaminaria*, de la structure et de la connectivité génétique des populations ainsi que de sa diversité génétique et par conséquent son potentiel adaptatif. Le chapitre 5 présentera l'étude de la répartition spatiale de cette diversité génétique ainsi que l'évaluation de l'importance de la reproduction végétative de l'espèce au sein de deux populations.

## **Chapitre 2 : Ecology and conservation of Belgian populations of *Viola calaminaria*, a metallophyte with a restricted geographic distribution**

Ce chapitre correspond à la première étape (Chapitre 1) dans la mise en place de stratégies de conservation: l'étude écogéographique. Après une revue de la littérature, il est apparu que les données sur la distribution de l'espèce en Région Wallonne et sur son autoécologie étaient insuffisantes et incomplètes.

Cette étude vise donc essentiellement à récolter des données de base sur l'espèce, notamment sur sa distribution et son écologie. Dans un premier temps, nous avons recensé l'ensemble des sites hébergeant *Viola calaminaria* en Région Wallonne et préciser la répartition des populations. La densité en *V. calaminaria* au sein des populations a également été estimée, ce qui a permis d'évaluer la taille des populations. Ensuite, l'écologie de l'espèce a été précisée par l'étude de son habitat sur base de relevés floristiques et de paramètres édaphiques (notamment le pH et les teneurs en métaux lourds).

## Abstract

*Viola calaminaria* (Gingins) Lej. is a rare and threatened species, endemic to metalliferous soils in E Belgium, S Netherlands and W Germany. In order to provide basic information for a conservation strategy, we performed an ecogeographic survey of almost all *V. calaminaria* populations currently existing in Belgium. Twenty-three populations were found, distributed in three geographic groups all in the Province of Liège. The area covered by *V. calaminaria* ranged from < 1 m<sup>2</sup> to 3.2 ha. The largest populations were found in sites contaminated by atmospheric deposits from metal smelters. Soils were extremely variable in heavy metal and nutrient concentrations, but concentrations of Zn, Pb and Cd were consistently higher than reference values for normal soils. *V. calaminaria* was most often found in association with other metallophyte and pseudometallophyte taxa typical of metalliferous sites. Plant communities identified by TWINSPAN analysis generally fitted the heavy metal associations previously described but two unusual heavy metal plant communities were identified. Based on a canonical correspondance analysis, pH was the only factor that was clearly correlated with the floristic composition of plant communities associated to *V. calaminaria*. This study confirmed the ecological endemic status of *V. calaminaria* and the importance of the conservation of metalliferous sites.

Key words: *Viola calaminaria*, rare species, heavy metals, ecogeography, conservation.

---

*J.P. Bizoux, F. Brevers, P. Meerts, E. Graitson and G. Mahy*

*Published in the Belgian Journal of Botany, 137 (1): 91-104, 2004.*

## 2.1 Introduction

A taxon can be considered as rare when it meets at least one or a combination of the following criteria: 1) restricted geographic distribution, 2) habitat with restricted ecological conditions, 3) small population size (Olivieri and Vitalis 2001). Rarity in itself is not synonymous with extinction threats (de Langhe and Norton 2004), but because of their limited geographical and ecological extension, rare endemic taxa are more prone to be driven to extinction by anthropogenic habitat destruction. While rare endemic taxa are often adapted to scattered small habitats, habitat fragmentation may increase the risk of local population extinction due to demographic stochasticity, genetic drift and inbreeding (Primack 1998, Olivieri and Vitalis 2001). For these reasons, rare endemic taxa are considered as priority targets for biodiversity conservation programme in particular when threats on their habitat can be clearly identified (Schemske *et al.* 1994, Doust and Doust 1995, Primack 1998). As a first approach, the conservation of rare endemic taxa requires an investigation into their biogeography, including geographic distribution, niche characterisation and particularly the limiting environmental factors and the impact of human factors, both past and present (Debussche *et al.* 1996, Dinsdale *et al.* 1997, Maxted 1999, de Langhe and Norton 2004).

Soils with high concentrations of heavy metals (metalliferous soils) are a good example of scattered habitat. Because of their phytotoxicity, metalliferous soils represent very restrictive habitats for plants (Antonovics *et al.* 1971, Ernst 1990, Macnair and Baker 1994, Brown 2001). In addition, metalliferous sites are generally of small size and geographically isolated from each other within a landscape matrix with normal background metal concentrations (but see Wolf 2001 for a discussion of scale effect). These sites provide outstanding examples of micro-evolution and speciation processes due, on the one hand, to the severe selection pressure induced by heavy metals and, on the other hand, to founder effects and genetic drift induced by the insularity of these habitats (Ernst 1990, Lefèbvre and Vernet 1990, Mengoni *et al.* 2000). As a result, metalliferous sites often host rare, ecologically endemic taxa adapted to high levels of heavy metals. In Belgium, metalliferous sites consist of calamine soils exhibiting high concentrations of zinc, cadmium and lead (Lambinon and Auquier 1964, Simon 1978, Duvigneaud 1982, Duvigneaud *et al.* 1993, Duvigneaud and Saintenoy-Simon 1996). These sites host a number of metallophytes at various taxonomic ranks (Duvigneaud 1982, Duvigneaud *et al.* 1993, Duvigneaud and Saintenoy-Simon 1998).

Of all these taxa, *Viola calaminaria* (Gingins) Lej. is of particular interest. *Viola calaminaria* was first described by Lejeune (1811). It was initially regarded as a variety (*Viola lutea* Huds. var. *multicaulis* Koch ; Lejeune 1811) or as a subspecies of *Viola lutea* Huds. (*Viola lutea* Huds. subsp. *calaminaria* (Gingins) Nauenburg ; Nauenburg 1986) on the basis of morphological characters. More recently, on the basis of cytological criteria, it was considered as a true species derived from *Viola tricolor* L. subsp. *subalpina* Gaud. by polyploidisation during the ice age (Heimans 1961, Kakes 1979). Ernst (cited in Kakes and Everards 1976) argued that *V. calaminaria* recently derived from *Viola tricolor* L. while Rostanski (2003) argued that *V. calaminaria* is not distinct from *Viola lutea*. According to Ernst (1990) and Kakes (1977), two subspecies should be recognised within *V. calaminaria*: *Viola calaminaria* subsp. *calaminaria* Lej. and *Viola calaminaria* subsp. *westfalica* (Lej.) Ernst, the latter with purple flowers being restricted to W Germany. Other authors considered them as two distinct species: *Viola calaminaria* and *Viola guestphalica* Nauenburg (Nauenburg 1986, Hildebrandt *et al.* 1999, Rostanski 2003). In Belgium, *V. calaminaria* is considered as a rare calamine-endemic species (Lambinon *et al.* 1992). Undoubtedly, whatever its taxonomic position, *V. calaminaria* represents an original genetic pool differentiated from related species and is worth of conservation effort because of its ecological particularity.

Calamine sites are threatened in Belgium. They are often considered as waste ground dangerous for human health and for which public authorities are inclined to promote site remediation. Several sites have disappeared over the past decades and others have been partially altered by mining, grazing, road or public equipment building and recreational activities (Duvigneaud 1982, Graitson 2004). This pressure has led to habitat loss and fragmentation, decrease in number and size of remaining metallophyte populations and consequently potential problems of population and metapopulation viability for metallophyte taxa. Current knowledge of *V. calaminaria* ecology and distribution is still incomplete. This was illustrated by the recent discovery of previously overlooked populations (Duvigneaud 1976, Jortay 1984, Graitson 2004). Up to now, no study has specifically assessed the ecological niche of the species. In particular, the range of high heavy metal concentrations required for the development of *V. calaminaria* populations is not known.

The aim of this study was to assess the distribution and ecological amplitude of *V. calaminaria* in Belgium in order to provide the basis for the definition of a conservation strategy. Specific aims were: i) to examine the current distribution of the species and evaluate the size of the populations, ii) to assess the ecological amplitude of the species in relation to



heavy metals in soil, and iii) to study the associated flora and vegetation of *V. calaminaria* populations.

## 2.2 Material and methods

### 2.2.1 Plant species

*V. calaminaria* is a perennial clonal pansy with a prostrate habit (8 to 40 cm). Vegetative propagation is achieved by means of long rhizomes. The species flowers from May to October with the flowering peak between May and July. Flowers are generally yellow but some individuals exhibit light to dark blue petals (Lambinon *et al.* 1992). The species distribution includes the east of Belgium (north east of the Liège province), the south east of Dutch Limburg and the vicinity of Aachen (west of Germany).

### 2.2.2 Population survey

Historical records of *V. calaminaria* in the Walloon Region (South Belgium) have been documented on the basis of a review of the specialised naturalist and scientific literature (e.g., Lambinon and Auquier 1964, Duvigneaud 1982, Duvigneaud and Jortay 1987, Duvigneaud *et al.* 1993, Fagot 1993, Duvigneaud and Saintenoy-Simon 1996, Beckers 1997) and on the recent synthesis by Graitson (2004). All sites with historical or recent reports of *V. calaminaria* populations were visited in the spring of 2003 to check for the presence of the species. The size of *V. calaminaria* populations was estimated. Because of the clonal habit of the species, we were not able to census the number of individuals (i.e., genets). *V. calaminaria* is generally distributed in patches of various densities. The size of each population was then evaluated as the surface area covered by the species on the basis of a combination of two parameters: the total surface of patches in the site and the percentage of ground cover of the species in these patches. The outlines of patches were delimited by GPS. Patch area was calculated with the Xtools ArcView extension. The percentage of *V. calaminaria* groundcover was estimated for each patch on the basis of the linear cover of the species. To that end, the cover of the aerial parts of the species was measured (precision: 5 cm) along a graduated line randomly located within each patch. The percentage of groundcover was estimated as the ratio between the total length covered by *V. calaminaria* (m) and the total length of the transect (m). When *V. calaminaria* was present in different plant communities, the percentage of cover was evaluated separately for each of them.

The two measures (percentage of cover within patches and total area of patches) were multiplied to obtain a population area estimate used as a surrogate of population size.

### 2.2.3 *Ecological amplitude of the species*

#### 2.2.3.1 *Population sampling*

As one of the aims of the study was to make a synthesis of the ecological amplitude of *V. calaminaria* in regard to the recent discovery of new populations, floristic and soil analyses focused on populations for which no ecological data could be found in the literature. Sampled sites were assigned to one of the following categories: i) primary sites that are natural mineral outcrops (I), ii) secondary sites in place that result from mining activities in primary sites (IIa), iii) industrial secondary sites that consist of furnace slag and cinders resulting from industrial activity (IIb) and iv) tertiary sites resulting from atmospheric pollution (III). Thirteen sites were selected to be representative of the different origins and geographical regions. At each site, a stratified sampling strategy was used to ensure that the full ecological variation of the populations was described. On a brief reconnaissance, the surfaces where *V. calaminaria* was present were divided into major vegetation types on the basis of the vegetation structure and dominant species (facies). Sampling quadrats for floristic "relevés" and soil sampling (same quadrats) were located in the different major communities associated to *V. calaminaria* within each site.

##### 2.2.3.1.1 Associated flora and plant communities

In each site, three floristic "relevés" (1.5 m x 1.5 m quadrats) were performed in each vegetation facies using the Braun-Blanquet scale. Three to nine "relevés" were obtained in each site for a total of 63 "relevés" (see Table 2.1 for identification of sites in the vegetation analysis). Nomenclature followed Lambinon *et al.* (1992). Vegetation data were analysed using two-way indicator species analysis (Twinspan; Hill 1979).

##### 2.2.3.1.2 Soil analysis

Ten out of the thirteen selected sites were retained for soil analysis (sites for which no data existed in the literature, see Table 2.1). Three bulk samples were collected at each site (at least one sample per facies) for a total of 30 samples. All samples were collected within the quadrats used for the vegetation "relevés". In two quadrats (Terbrugen site), *V. calaminaria* was not present. Each sample consisted of five bulked subsamples (depth 0-15 cm, organic layer excluded) collected at the four corners and the center of the quadrat. Samples were air-

dried, sieved to 2 mm, and weighted before and after sieving. The proportion of stones was determined as the ratio of the weight of particles larger than 2 mm to the total dry weight of the sample.  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$  was measured for each sample with a digital pH-meter. Cations were extracted with 1N ammonium acetate-EDTA (pH 4.65) by the Cottenie method (Cottenie *et al.* 1975). Ca, Zn, Cd, Pb concentrations were determined by ICP-OES. Pb/Ca and Zn/Ca ratios were calculated as they better reflect actual metallic toxicity than absolute metal concentrations (Simon 1978, Garland and Wilkins 1981, Brown 2001).

Statistical analyses were performed with xlstat version 6.0 and minitab version 13.20. Relationships between floristic data and soil parameters were examined by a canonical correspondance analysis (CCA) using canoco for windows version 4.5 (Ter Braak and Smilauer 2002).

## 2.3 Results

### 2.3.1 Population survey

A total of twenty-three populations were found (Fig. 2.1, Table 2.1). Some of the observed populations were very close to each other (less than 50 m) and may thus represent subpopulations from a genetic point of view. Nevertheless, as our survey should be useful for a conservation strategy, we considered that groups of individuals separated spatially from other groups of individuals and situated in sites with different land occupation were different populations, each one of which forming a distinct management unit.

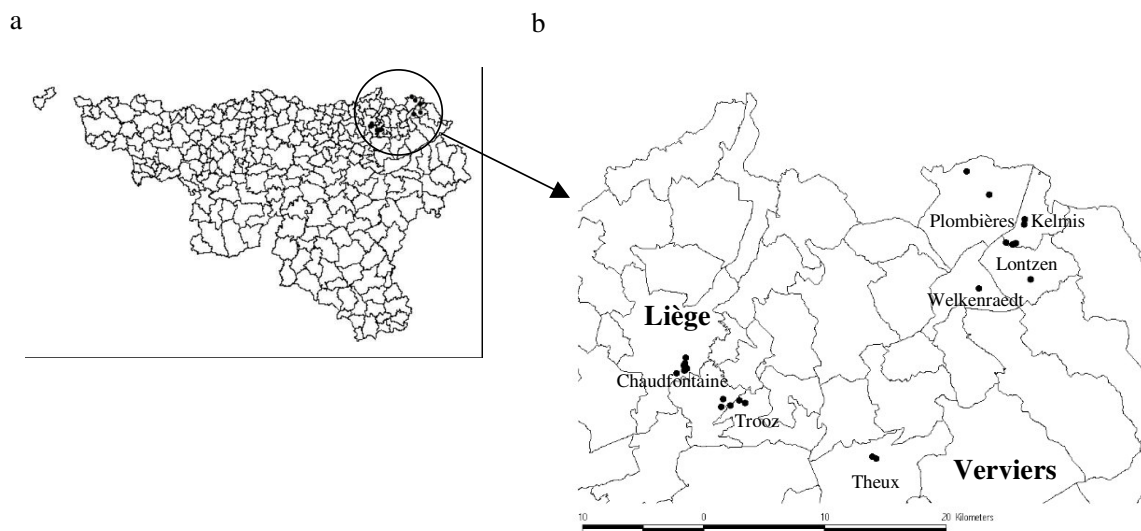


Fig. 2.1: Localisation of *V. calaminaria* populations (represented by a black circle) in a) Wallonia, b) Eastern Wallonia.

All populations were located in the Province of Liège. Three geographic groups could be identified (fig. 2.1b): 12 populations in the vicinity of Liège, two populations in the vicinity of Theux and nine populations in the region of Kelmis. The cumulated size of all populations was 6.09 ha. The size of individual populations varied greatly (Table 2.1, Fig. 2.2). Four populations were extremely small (< 1 m<sup>2</sup>), six populations displayed a small size (between 1 m<sup>2</sup> and 100 m<sup>2</sup>), 12 populations displayed a moderately large size (from 100 m<sup>2</sup> to 1 ha) and the largest one reached over 3.22 ha. The single largest population (Prayon) represented 53% of the total *V. calaminaria* area. A significant positive correlation was found between the total site area and the size of the area occupied by *V. calaminaria* in each site (Spearman rank correlation,  $r^2 = 0.64$ ,  $P < 0.001$ ). The correlation was still significant when the largest site with the largest population (Prayon) was removed (Spearman rank correlation,  $r^2 = 0.60$ ,  $P < 0.001$ ).

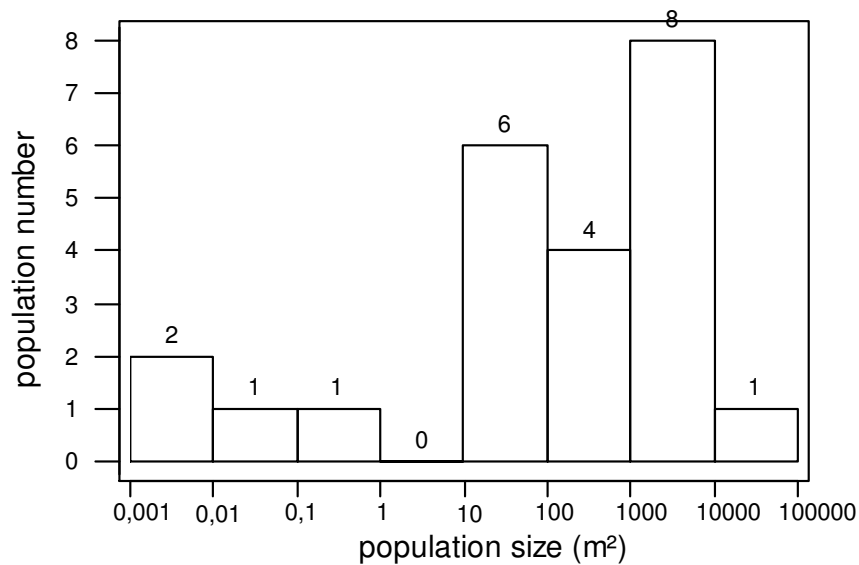


Fig. 2.2: Frequency distribution of *V. calaminaria* population size expressed as the area covered by the species (m<sup>2</sup>). See text for details on surface estimation

## Chapitre 2: Ecogeographic survey of *Viola calaminaria*

Table 2.1: List of sites hosting *V. calaminaria* with localisation (commune and x, y Lambert coordinate), altitude, total areas, types of sites, *V. calaminaria* population sizes estimation (patch size multiplied by % cover), Twinspan groups classification (only phytosociological sites study) and sites localization of "relevés" (only sites with soils samples).

Name	Commune	X_center Lambert coordinate	Y_center Lambert coordinate	Altitude (m)	Site area (ha)	Type of sites	Population size (m <sup>2</sup> )	TWINSPAN groups	Site localisation of relevés (Rx)
Ancien jumping de Chaudfontaine	Chaudfontaine	241041	142500	80	4,11	III	1769		
Bois-les-Dames	Chaudfontaine	240835	141864	200	51,68	III	4590	G7	R1, R2, R4
Fonds-de-Forêt	Trooz	242837	142164	115	6,64	III	1651		
Prayon	Trooz	242333	142372	160	51,97	III/IIb	32242	G7	R19, R22, R25
Jardin à Prayon	Trooz	241614	141931	80	0,11	III	0,002		
Ile aux Corsaires	Liège	237854	145398	60	3,71	IIb/III	3587		
Friche industrielle à Angleur	Liège	237771	145264	60	3,86	IIb/III	1517	G6	R7, R8, R10
Petit remblai à Angleur	Liège	237931	145106	65	0,07	IIb/III	19		
Parc de la Vieille Montagne	Liège	237826	144819	65	7,78	III	4898		
Voie ferrée et gare à Chênée	Liège	238042	145007	70	0,96	III	304		
Sur-les-Tiers	Liège	237924	145896	110	2,21	III	3744	G7	R13, R14, R15
Lande de Streupas	Liège	237184	144599	160	16,67	III	219	G2	
Halde du Casino	Kelmis/La Calamine	265849	156835	180	2,75	IIb	36	G1	
Réserve de La Calamine	Kelmis/La Calamine	265920	157253	190	0,37	I	0,4	G4	R34, R35, R36
Schmalgraf	Kelmis/La Calamine	264867	155173	190	0,9	IIa	150	G2, G3	
Petite halde du Schmalgraf	Kelmis/La Calamine	264357	155331	233	0,05	IIb	60	G3, G6	R46, R47, R48
Pelouse près de la ferme Huset	Kelmis/La Calamine	265130	155293	210	0,07	I	0,002	G5	R49, R50, R51
Rabotrath	Lontzen	266390	152285	260	1,67	IIa	60	G3, G4	R52, R53, R54
Plombières	Plombières	262974	159322	155	22,82	IIa/IIb	5815		
Terbruggen	Plombières	261083	161234	135	0,16	IIb	0,06	G1	R55, R56, R57
Ru de Wilcour	Welkenraedt	262126	151273	260	0,39	IIa	145		
Le Rocheux	Theux	253651	137567	230	3,47	IIa	25	G2, G4	R58, R59, R61
Petit tumulus face au Rocheux (Sud)	Theux	253425	138072	225	0,06	IIb	51		

### 2.3.2 Associated flora and plant communities

The classification groups resulting from the Twinspan analysis are shown in Table 2.2. Only characteristic species (indicator and preferential) identified by twinspan are shown (31 species on a total of 54 across all "relevés"). Seven groups of "relevés" were identified (G1-G7). The classification of the different sites in the groups of "relevés" is displayed in Table 2.1. Group G1 was composed of *Festuca* sp. associated with *Deschampsia cespitosa*, *Phragmites australis*, *Stellaria holostea*, *Silene vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *humilis*, and *Polygala vulgaris*. *Deschampsia cespitosa* and *P. australis* indicated a relatively high water table. Group G2 contained *Molinia caerulea*, *Calluna vulgaris*, *Festuca ophioliticola* subsp. *calaminaria*, and *Cerastium fontanum* as character species associated with *Holcus lanatus*, *Luzula campestris*, and *Rumex acetosa*. The first two characteristic species indicated relatively acid conditions. Group G3 was composed of *Agrostis capillaris*, *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminare*, and *Festuca ophioliticola* subsp. *calaminaria* as characteristic taxa with *Molinia caerulea*, *Plantago lanceolata*, and *Ranunculus acris*. Group G4 was characterised by *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminare*, *Armeria maritima* var. *halleri*, *Polygala vulgaris*, and *Festuca ophioliticola* subsp. *calaminaria* associated with *Avenula pratensis*, *Minuartia verna* var. *hercynica*, *Rumex acetosa*, and *Silene vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *humilis*. It was the group with the largest number of metallophytes. Group 5 comprised all "relevés" from a single site (Huset) and was characterised by *Galium mollugo*, *Ranunculus acris*, *Silene dioica*, and *Silene latifolia* subsp. *alba* associated with *Festuca* sp., *Lamium galeobdolon*, *Pimpinella saxifraga*, *Festuca ophioliticola* subsp. *calaminaria*, and *Stellaria holostea*. Most of these species were not found on the other sites and were characteristic of forest fringes on nutrient-rich soils. *Silene vulgaris* var. *humilis* and *Armeria maritima* var. *halleri* were characteristic taxa of group G6, associated with *Campanula rotundifolia*, *Carex spicata*, *Plantago lanceolata*, and *Arrhenatherum elatius*. Group G7 was characterised by *Agrostis capillaris* as character species associated with *Cerastium fontanum*, *Rumex acetosa*, and *Sonchus asper*.

Table 2.2: Classification groups obtained with Twinspan analysis. Only key and preferential species are shown. Constance coefficient: I: species present in less than 20 % of relevés, II: species present in 20 % to 40 % of relevés, III: species present in 40 % to 60 % of relevés, IV: species present in 60 % to 80 % of relevés, V: species present in 80 % to 100 % of relevés. Key species are identified by constant coefficient in bold type.

Species / Groups	G 1	G 2	G 3	G 4	G 5	G 6	G 7
<i>Viola calaminaria</i>	IV	V	V	V	V	V	V
<i>Ranunculus acris</i>			III		<b>V</b>		
<i>Plantago lanceolata</i>			III			IV	
<i>Silene vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> var. <i>humilis</i>	III			II		<b>V</b>	
<i>Agrostis capillaris</i>			<b>IV</b>				<b>IV</b>
<i>Cerastium fontanum</i>		<b>III</b>					III
<i>Molinia caerulea</i>		<b>IV</b>	II				
<i>Polygala vulgaris</i>	II			<b>IV</b>			
<i>Rumex acetosa</i>				III			V
<i>Armeria maritima</i> var. <i>halleri</i>				<b>IV</b>		V	
<i>Stellaria holostea</i>	II				IV		
<i>Deschampsia cespitosa</i>	II						
<i>Festuca</i> sp. (FES 1)	<b>V</b>						
<i>Phragmites australis</i>	II						
<i>Calluna vulgaris</i>		<b>III</b>					
<i>Holcus lanatus</i>		II					
<i>Luzula campestris</i>		II					
<i>Thlaspi caerulescens</i> subsp. <i>calaminare</i>			II	V			
<i>Avenula pratensis</i>				II			
<i>Minuartia verna</i> var. <i>hercynica</i>				III			
<i>Festuca ophioliticola</i> subsp. <i>calaminaria</i>		<b>V</b>	V	V	II		
<i>Festuca</i> sp. (FES 2)					II		
<i>Galium mollugo</i>					<b>II</b>		
<i>Lamium galeobdolon</i>					II		
<i>Silene latifolia</i> subsp. <i>alba</i>					<b>V</b>		
<i>Silene dioica</i>					V		
<i>Pimpinella saxifraga</i>					II		
<i>Campanula rotundifolia</i>						II	
<i>Carex spicata</i>						II	
<i>Sonchus asper</i>							II
<i>Arrhenatherum elatius</i>						IV	
Number of relevés per group	9	9	9	8	3	7	18

### 2.3.3 Soil parameters variability

#### 2.3.3.1 Soil parameters description

Soil pH was rather homogeneous, with most samples comprised between pH 6.0 and pH 7.0 (mean  $\pm$  SD = 6.36  $\pm$  0.75; Fig. 2.3b). *V. calaminaria* can thus be considered as a neutrophilous species. The proportion of soil particles larger than 2 mm varied from 1.3% to 53.5 % (mean  $\pm$  SD = 26.9  $\pm$  15.5 %; Fig. 2.3a), indicating that the species can accommodate soils with very different stoniness.

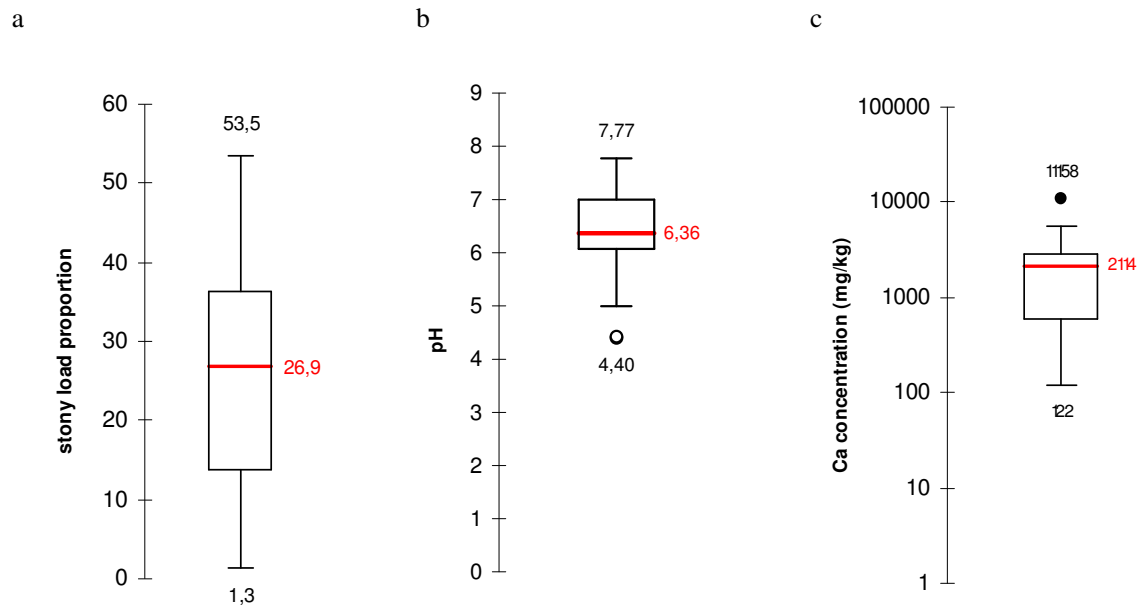


Fig. 2.3: Variation of selected soils properties in ten populations of *V. calaminaria*. Box and whisker plots: a) stony load proportion (%), b) pH and c) Ca concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

The heavy metals content (Pb, Cd, Zn) was quite variable (up to three orders of magnitude; Fig. 2.4 a-c). Nevertheless, these concentrations were always largely superior to heavy metal concentrations in normal soils and in most cases were superior to phytotoxicity levels. Zinc concentrations ranged from  $105 \text{ mg kg}^{-1}$  to  $43619 \text{ mg kg}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD =  $11886 \pm 13695 \text{ mg kg}^{-1}$ ) but most of the samples (83 %) had a concentration superior to  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ . Lead concentrations ranged from  $85 \text{ mg kg}^{-1}$  to  $85329 \text{ mg kg}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD =  $9342 \pm 19539 \text{ mg kg}^{-1}$ ) with most samples ranging from  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  to  $10000 \text{ mg kg}^{-1}$ . Cadmium concentrations varied from  $1.1 \text{ mg kg}^{-1}$  to  $117 \text{ mg kg}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD =  $24 \pm 27 \text{ mg kg}^{-1}$ ). The sites Friche d'Angleur, Prayon, Huset, Rabotrath and Rocheux (see Table 2.1 for location) presented the highest concentrations in Zinc whereas for Pb the highest concentrations were observed in Huset, Rocheux and Friche d'Angleur. Pb/Ca and Zn/Ca ratios were highly variable. Pb/Ca (mean  $\pm$  SD =  $3.1 \pm 3.7$ ) was highest in Rocheux, Huset and Friche d'Angleur whereas Zn/Ca (mean  $\pm$  SD =  $5.8 \pm 6.0$ ) was highest in Rocheux, La Calamine, Prayon and Rabotrath (Fig. 2.4d).



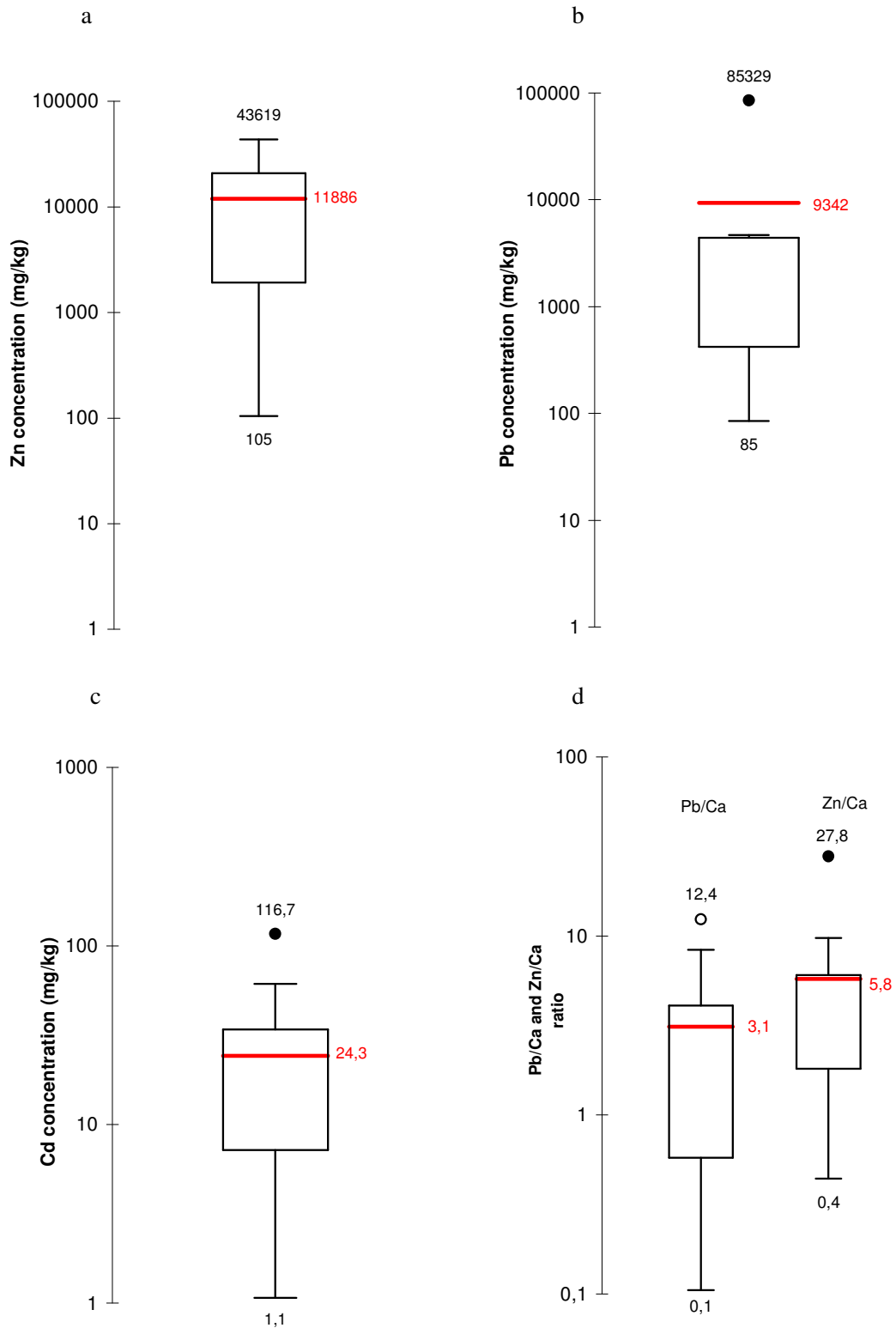


Fig. 2.4: Variation in heavy metals concentration in ten populations of *V. calaminaria*. Box and whisker plots: a) Zn concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), b) Pb concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), c) Cd concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) d) Pb/Ca and Zn/Ca ratio.

Mean values of soil parameters were compared between the different site categories (primary, secondary in place, industrial secondary and tertiary) with a two-way nested ANOVA with populations nested within site category. Two sites were considered as primary (Huset and La Calamine), two as secondary (IIa: Rocheux and Rabotrath), three as secondary (IIb: Friche d'Angleur, Terbruggen and Petite halde du Schmalgraf) and three as tertiary (Prayon, Bois les Dames and Sur le Tiers). Significant variations were found among populations within categories for Zn, Pb, Cd, Ca, Pb/Ca, Zn/Ca, pH, Mg. In contrast, no significant variation was found between the different site categories.

### 2.3.3.2 Influence of soil conditions on associated vegetation

In order to investigate the relationships between floristic variation and soil factors, data from quadrats with both floristic "relevés" and soil analyses (30 quadrats, 40 species and 9 soils parameters) were analysed by CCA. Fig. 2.5 and 2.6 displays the first two axes of a quadrat-environment biplot and a species-environment biplot with the three significant soil variables selected by a Monte-Carlo test. The eigenvalues were 0.338 for the first axis and 0.279 for the second axis. Together, these two axes explained 18.6 % of the floristic composition variation and 81.4 % of the species-environment relationship.

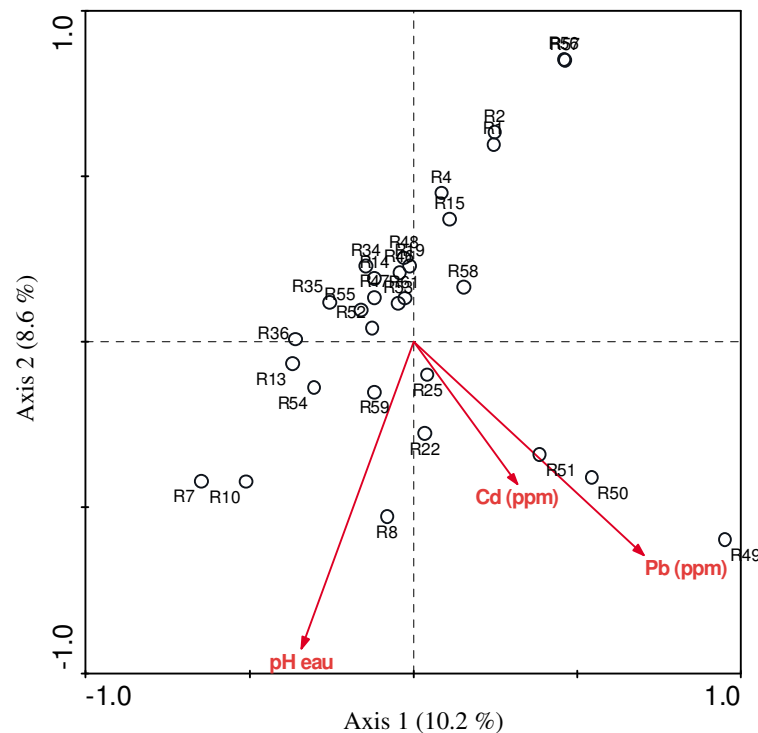


Fig. 2.5: Quadrat-environment biplot from the CCA based on thirty quadrats from ten sites, using only significant environmental values.

Significant soil parameters were, by order of decreasing importance, Pb concentration ( $P = 0.007$ ),  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$  ( $P < 0.001$ ) and Cd concentration ( $P = 0.039$ ). Correlations between Pb and Cd concentration and axes were evenly split between the first two axes. Three "relevés" (R49, R50 and R51) from the same site were isolated in the quadrat of the biplot determined by Pb and Cd concentration. They formed a distinct group characterised by a particular species composition and corresponded to the G5 group in the Twinspan analysis (Table 2.2). pH was the variable most highly correlated with the second axis. This variable best explained the distribution of the other "relevés". "Relevés" on acidic soil (R56, R57, R2 ...) were characterised by *Agrostis capillaris*, *Luzula campestris* and *Holcus lanatus* while those on neutral soil (R7, R8, R10, R54 ...) were characterised by *Campanula rotundifolia* or *Carex spicata*.

Most metallophytes grouped together close to the centre of the plot: *V. calaminaria*, *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminare* or *Festuca ophioliticola* subsp. *calaminaria*.

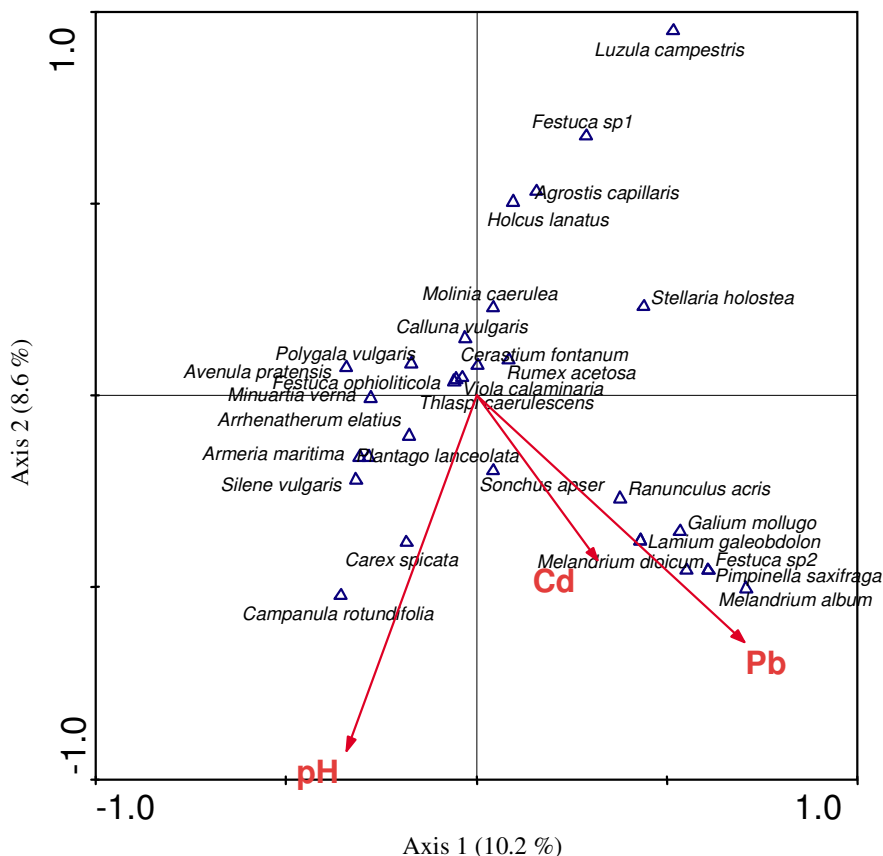


Fig. 2.6: Species-environment biplot from the CCA based on thirty quadrats from ten sites, using only significant environmental values and only preferential and key species identified by TWINSpan. Sites localization of "relevés" (Rx) is given in Table 2.1.

The same analysis was performed after removing "relevés" from the Huset site (R49, R50, R51), which presented a very specific floristic composition. The species-soil parameter biplots of the first two axes (Fig. 2.7) differed from the previous analysis. The eigenvalues were 0.328 for the first axis and 0.222 for the second axis. Together the two axes explained 17.7 % of the species composition variation and 78.6 % of the species-environment relationship. pH (highly correlated with axis 1) was the single most important variable explaining floristic variation ( $P = 0.001$ ). Ca was the second significant variable explaining floristic variation ( $P = 0.036$ ) evenly split between axis 1 and axis 2. Cd was only marginally significant ( $P = 0.055$ ) and was mostly correlated with axis 2. No group structure appeared in this graph. Species tended to form a continuum along axis 1 from more acidophilus species (*Agrostis capillaris*, *Luzula campestris* or *Molinia caerulea*) to neutrophilous ones (*Campanula rotundifolia* or *Silene vulgaris*). Zn, Pb, Zn/Ca, Pb/Ca were not significantly correlated with the axes and the floristic variation.

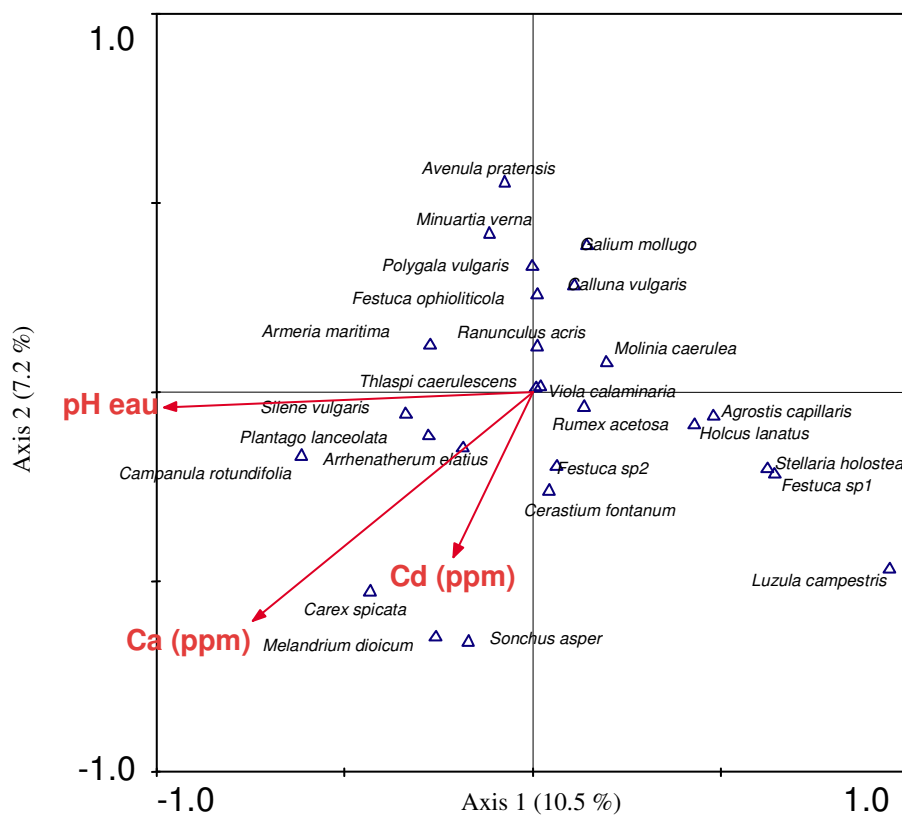


Fig. 2.7: Species-environment biplot from the CCA based on twenty seven quadrats taken from nine sites ("relevés" of the Huset population have been removed) using only significant environmental values and only preferential and key species identified by Twinspan analysis.

## 2.4 Discussion

*V. calaminaria* could be found in 23 metalliferous sites, which is about 55 % of all metalliferous sites present in Walloon Region. It must be noted that the entire distribution of *V. calaminaria* in Belgium was not totally covered by our study. A few populations had extended into private gardens, and could not be investigated. Also, a few isolated individuals of *V. calaminaria* are known to be present on alluvial banks of the Gueule river (Graitson 2004). *V. calaminaria* is also present in Germany in the vicinity of Aachen and Stolberg (Simon 1975, 1978), in the south east of Dutch Limburg (along the Gueule river; Willems 2004). Recently, a population was also found in northern France at Aubry (Tonin 2001). Mostly restricted to eastern Belgium and the Aachen region in Germany, *V. calaminaria* has always been rare. From the end of 19<sup>th</sup> century to the 1970s, new populations appeared in the vicinity of Liège as a result of increasing habitat availability caused by industrial pollution (tertiary sites; Jortay 1984).

However, more recently, the number and size of populations have decreased because some sites have been rehabilitated. Graitson (2004) found that at least six historical metalliferous sites that hosted populations of *Viola calaminaria* have completely disappeared over the last century. With the recent disappearance of four *Viola* populations found in the present study, we may thus consider that a total of ten *V. calaminaria* populations have recently disappeared. In other sites, nine populations have been partially destroyed and other populations are disturbed by grazing or mowing.

Our results confirmed that, in Walloon Region, *V. calaminaria* is endemic to metalliferous sites and is therefore an absolute metallophyte despite its recent geographic expansion. Soil exhibited high concentrations of heavy metals, always in excess of normal values and phytotoxicity thresholds (de Temmerman *et al.* 1984). Brown (1994, 1995) reported that heavy metal vegetation generally develops on soil with Pb/Ca ratio greater than 1 and Zn/Ca ratio greater than 0.2. In the present study, these ratios averaged over all populations were much higher than these threshold values (mean Pb/Ca = 3.1 , mean Zn/Ca = 5.8). Interestingly, 19 samples out of 32 (60%) had values of Pb/Ca much lower or only marginally superior to 1.0 while all samples had Zn/Ca ratio higher than 0.2. This suggests that *V. calaminaria* may be restricted to soils where toxicity is mainly due to Zinc or that *V. calaminaria* may be more sensitive to Pb. In contrast, *V. calaminaria* seems less sensitive to other soil parameters. The majority of populations were found on soils with neutrophilous pH. Also, soil stoniness did not seem to be an important factor in the distribution of the species.

Besides the definition of the ecological amplitude, population size estimates are important information for the definition of a conservation strategy for rare species. In a first approach, larger populations may be expected to present a higher probability of long term viability due to lower genetic drift and reduced demographic stochasticity. They should then be considered as priority targets for conservation purposes. *V. calaminaria* displayed extremely variable population sizes and spatial population structures. The largest populations were found on tertiary sites where *V. calaminaria* has experienced recent demographic expansion. For some of these sites, populations are less than 30 years old. This rather recent origin of the largest populations points to the high potential for demographic expansion of the species. Nevertheless, in the case of *V. calaminaria*, care should be taken when giving conservation priority to tertiary sites solely on the basis of population size. Interestingly, the only two "relevés" where *Viola* was lacking (Terbruggen) had the lowest concentrations of Zn and Cd in the soil. This may indicate that moderately contaminated sites are less suitable for *V. calaminaria*. This hypothesis will have to be verified as it might have important consequences for the definition of priorities for site conservation. Indeed, heavy metal concentrations in surface soil of tertiary sites will certainly decrease in the long term due to the current absence of atmospheric deposit. As a result, populations of *V. calaminaria* on these sites may not be viable in the long term. Threshold concentrations of Zn in the soil required for the long-term viability of *V. calaminaria* populations will have to be determined. Also, it may be hypothesized that populations from tertiary sites still reflect recent founder effect. These populations may thus present reduced genetic diversity in comparison to smaller populations in primary sites, which may have retained the initial genetic diversity of the species.

The plant communities associated to *V. calaminaria* are representative of the diversity of the metalicolous plant communities in NW Europe (Brown 2001) and in Belgium (Duvigneaud 1982, Duvigneaud *et al.* 1993): *Violetum calaminariae typicum* and the more basicline variant of the association, *Violetum calaminariae callunetosum*; *Agrostis capillaris* grasslands with pseudometallophytes and an impoverished set of metallophytes, a particular facies of the *Violetum calaminariae typicum* (Brown 2001); *Arrhenatherum* grasslands (Brown 2001). More unusual plant communities for heavy metal soils were also found. A group of "relevés" (from the same site) was representative of a high trophic level most probably due to leaching from adjacent cultivated fields. An other group comprised several species indicating moist soil conditions (*Deschampsia cespitosa*, *Phragmites australis*). This diversity of plant communities confirms the relatively large amplitude of *V. calaminaria* for soil conditions

other than heavy metal concentrations. Only the *Violetum calaminariae achilletesum*, typical of more basicline soils, was not present in our "relevés". Surprisingly, the CCA analysis did not indicate a strong influence of heavy metal concentrations on the floristic composition of the studied communities. In particular, Zn or the ratio Pb/Ca or Zn/Ca were not significantly discriminant variables even though they are often considered as variables that affect the flora in metalliferous sites (Simon 1978, Brown 2001). The CCA analysis showed that pH is the main integrative factor that affects the floristic composition of heavy metal plant communities.

From our data, it is clear that the protection of *V. calaminaria* is closely linked to the protection of calamine sites and, in particular, of sites that will retain high concentrations of heavy metals in the long term.





### **Chapitre 3 : Spatial and temporal variation of reproductive success in an endemic metallophyte, *Viola calaminaria*: implications for conservation.**

Dans le chapitre 2, nous avons récolté des données de base sur l'espèce, notamment sur sa distribution et son écologie, nécessaires pour la mise en place de stratégies de conservation mais aussi très importantes pour la réalisation des autres parties de l'étude. Des données fondamentales, comme la taille des populations, ont été estimées et seront utilisées dans les chapitres suivants pour tester certaines hypothèses.

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre 1, les études démographiques sont de première importance en biologie de la conservation car elles permettent d'identifier d'éventuels stades de développement critique pour la viabilité des populations. Dans ce chapitre, nous avons étudié un point clé du cycle d'une espèce affectant son recrutement: le succès reproducteur. D'une part, sur un nombre limité de populations, la variation temporelle du succès reproducteur a été estimée en relation avec l'habitat et la densité en *V. calaminaria*. D'autre part, sur un nombre de populations plus important, la production de graines (nombre de graines/fruit) et le taux de germination ont été étudiés en relation avec la taille et l'isolement des populations, l'histoire des populations et les conditions pédologiques. Cette étude a permis d'estimer la variation du succès reproducteur de l'espèce et de déterminer les facteurs responsables de cette variation ainsi que d'établir dans quelle mesure le succès reproducteur influençait la viabilité des populations.

Il est nécessaire ici de préciser la délimitation des populations. Dans le chapitre 2, nous avons confondu les termes sites et populations. Chaque site correspondait à une population car ils étaient considérés comme des entités de gestion différentes. Néanmoins, certains sites sont très proches les uns des autres (moins de 50 m) et peuvent donc correspondre à des sous populations en terme biologique ou génétique. Nous ne pouvons donc pas, pour les chapitres 3 et 4, suivre la même logique. En effet, comme nous visions à tester des hypothèses basées sur des principes génétiques, nous risquons de fausser les résultats. Une autre approche était nécessaire. On ne pouvait pas non plus rassembler sur la base d'une distance arbitraire (par exemple 200 m) tous les sites présents dans une zone. En effet, nous aurions oublié les barrières artificielles qui sont la cause de la fragmentation. Nous avons donc décidé de considérer comme populations différentes les sites où des barrières (rivière, route, etc.) entraînaient des discontinuités dans le couvert de *V. calaminaria* et par

conséquent entravaient les flux d'individus entre les populations. En général, la correspondance site/population ne posait pas de problème car les sites sont la plupart du temps bien individualisés et assez éloignés les uns des autres comme Plombières ou le Schmalgraf. Ils sont aussi souvent séparés par des routes, rivières, bâtiments industriels ou maisons comme, par exemple, entre Prayon, bois les dames et le jardin de Prayon. Néanmoins, les sites d'Angleur (Iles aux corsaires, Friche industrielle à Angleur, petit remblai à Angleur, les voies ferrées et gare de Chênée et le parc de la Veille Montagne) étaient eux plus problématiques. Deux populations ont été distinguées, séparées par une route et des bâtiments industriels: le parc de la Veille Montagne et le reste formant la population d'Angleur 2. A contrario, les sites eux-mêmes sont des zones homogènes sans réelle discontinuité de la végétation et sans barrière. Il n'y avait donc pas lieu à priori de séparer de grands sites en plusieurs populations.

## Abstract

We studied reproductive success variation of *Viola calaminaria*, a rare endemic metallophyte first in relation to plant density and vegetation structure, and secondly in relation to population size, isolation, history and soil conditions.

Vegetation structure did not influence density and reproductive success of the species.

Important monthly variation was found for all parameters of reproductive success except for seed set. Positive significant correlation was found between plant and flower density ( $r = 0.736$ ,  $P < 0.001$ ) while a negative significant correlation was observed between flower density and fructification percentage ( $r = -0.332$ ,  $P = 0.003$ ). No correlation between fruit density and seed set was found ( $r = 0.204$ ,  $P = 0.075$ ). These results suggest that competition between flowers for pollen influences the reproduction success of *V. calaminaria*.

Population size was not correlated to seed set and germination percentage. In contrast, population isolation had an important impact on seed set. Similarly, Zn/Ca and Ca/Mg ratios in soil influenced seed set and germination percentage. Recent populations resulting from pollution events exhibited significant higher reproduction success than ancient populations occurring on natural metalliferous sites. This implies that recent populations are important for the species conservation. We did not identify any critical reproduction stage limiting the survival of *V. calaminaria* populations.

Key words: *Viola calaminaria*, reproduction success, population size and isolation, conservation, population history, heavy metals.

### 3.1 Introduction

Because of their limited geographical and ecological extension, rare endemic taxa are considered as highly vulnerable and consequently are priority targets for biodiversity conservation (Schemske *et al.* 1994, Doust and Doust 1995, Primack 1998). Soils with elevated concentrations of heavy metals (metalliferous soils), because of their phytotoxicity, represent very harsh and restrictive habitats for plants (Antonovics *et al.* 1971, Ernst 1990, Brown 2001). As a result, and also because metalliferous sites are of small size and geographically isolated from each other, they often host rare, ecological endemic taxa adapted to high levels of heavy metals (Ernst 1990, Brown 2001, Wolf 2001). In eastern Belgium and western Germany, metalliferous sites consist in calamine soils exhibiting high concentrations of zinc, cadmium and lead and host metallophytes such as *Viola calaminaria* (Gingins) Lej., an endemic to calamine sites (Lambinon and Auquier 1964, Duvigneaud 1982). *V. calaminaria* historically occurred on natural metalliferous sites and on former mines (ancient populations). From the end of 19<sup>th</sup> century to the 1970s, new populations (recent populations) of *V. calaminaria* appeared as a result of the increase in habitat availability resulting from industrial pollution (Bizoux *et al.* 2004). In recent years, the species habitat destruction and site remediation has led to populations extinction or populations disturbing (Duvigneaud 1996, Bizoux *et al.* 2004). In this context, recently established populations may play an important role for species conservation.

Fitness and demographic studies are essential for a better understanding of population dynamics in order to establish conservation strategies because they can reveal critical stages in life cycles and allow prediction for the future development of populations (Lande 1988, Schemske *et al.* 1994, Oostermeijer *et al.* 2003). Such studies are especially useful when demographic parameters are related to temporal and spatial variation in habitat quality resulting from variation in environmental conditions (Oostermeijer *et al.* 1996, Oostermeijer *et al.* 1998, Eisto *et al.* 2000, Wolf and Harrison 2001). However, long-term studies assessing spatio-temporal variation do not cope with the urgency of conservation measures for species facing short-term threats (Oostermeijer *et al.* 1996, Menges 2000, Colas 2001, Fréville 2004). One may first need to assess how reproductive success varies among populations or habitats before modelling the species dynamics in long term. This is particularly relevant for rare species, with conservation needs and without prior knowledge (Fréville 2004).

Besides the direct effect of habitat quality, the reproductive success (and ultimately demography) may be influenced by population size and density through stochastic effect

(genetic drift inducing inbreeding depression) and/or deterministic effect (Allee effect). A potential consequence of small population size is the reduction of heterozygosity as a result of genetic drift and inbreeding. This may lead to increasing inbreeding depression, resulting in reduced performance of various fitness-related traits (Ellstrand and Elam 1993, Reed and Frankham 2003, Reed 2005). Most studies that have considered fitness in relation to population size were concerned with species that undergo a decrease in population number and size as an effect of habitat fragmentation (e.g. Fischer and Matthies 1998a, Reed and Frankham 2003, Pluess and Stocklin 2004a). However, rare ecological endemic species as metallophyte may be characterized by naturally small and isolated populations. Therefore, the impact of inbreeding depression on fitness may be lower in populations that have been small during several generations or in populations that have declined more slowly (Wolf and Harrison 2001, Leimu and Mutikainen 2005) because deleterious alleles may have been purged by selection (Schemske and Lande 1985, Charlesworth and Charlesworth 1987). Whether population size affects fitness in those species, in the same way than in species with recently fragmented habitats, is an unsolved question of importance for conservation (Leimu and Mutikainen 2005).

In addition to stochastic effect, viability of small or low-density population can be impacted throughout the so-called “Allee effect”, i.e. a negative effect of low density, small patch size, or patch isolation on individual fertility (Lande 1988, Groom 1998, Stephens *et al.* 1999, Oostermeijer *et al.* 2003). Because they are less apparent and offer less rewards, small and isolated populations or patches may be less attractive to pollinators than large populations and may consequently have lower reproductive success (Sih and Baltus 1987, Roll *et al.* 1997, Hendrix and Kyhl 2000). In the same way, within population, low plant density is likely to modify pollinators behaviour resulting in less pollinators visits, ultimately affecting fertilisation rates and/or resource allocation to ovules, fruits and seeds production (Sih and Baltus 1987, Fisher and Matthies 1998b, Colas *et al.* 2001, Mustajarvi *et al.* 2001, Oostermeijer *et al.* 2003).

Reproductive success may also be expected to vary in relation to population history. In recently founded populations, reproduction success and fitness could be reduced as a result of founding effect and genetic drift (Nei *et al.* 1975, Leimu and Mutikainen 2005). Nevertheless, rapid growth and expansion of populations can decrease these effects (Leimu and Mutikainen 2005).

Metallophyte species provides a good model to study the influence of scattered habitat and population history (recent versus ancient populations), selective pressure and

environmental variability on plant fitness and spatial reproductive success variation in relation to population size. Predicting the factors that affect reproductive success in plant populations faces the challenge that detailed studies (by necessity limited to few sites) are needed to examine variation at within population scale whereas general trends among populations can only be derived from assessment with simple measures over large scale (many sites).

The aim of the current study was to examine the reproductive success variation of *Viola calaminaria* in Belgium at two scales considering the most pertinent factors at each scale. More specifically this study focused on three main questions: 1) What is the spatial and temporal variation of the reproductive success during one year within and between populations in relation to *Viola* density and vegetation structure? 2) What is the spatial variation of two reproductive success parameters (seed set and germination percentage) at a larger scale in relation to population size and isolation, population history and soil conditions? 3) What are the implications of the observed pattern for the species conservation?

## 3.2 Material and methods

### 3.2.1 Plant species and study sites

*V. calaminaria* is a perennial clonal pansy with a prostrate habit. The species flowers from May to October. Flowers are generally yellow but some individuals exhibit light to dark blue petals (Lambinon *et al.* 2004). Little is known about the reproduction system and pollinators of the species. *V. calaminaria* is presumed to be mainly allogamous but self-incompatibility was not reported in the genus, thus low levels of autogamy cannot be excluded. The species distribution (Fig. 3.1) includes the East of Belgium (North East of the Liège province), the South East of Dutch Limburg and the vicinity of Aachen (West of Germany). *Viola calaminaria* was first described by Lejeune (1811). The taxonomic status of the species is questionable and a recent phylogenetic study (Hildebrandt *et al.* 2006) recommends classing it as *Viola lutea* subsp. *calaminaria* (Gingins). In Belgium, *V. calaminaria* is considered as a rare calamine-endemic species (Lambinon *et al.* 2004). Undoubtedly, whatever its taxonomic position, this taxa represents an original genetic pool differentiated from related species and is worth of conservation effort because of its ecological particularity. In Belgium, 23 populations (range of population size: 0.4 m<sup>2</sup> - 32242 m<sup>2</sup>) of *V. calaminaria* are known (Bizoux *et al.* 2004) and two types of populations, ancient and recent, can be distinguished. Ancient populations occur on naturally calamine sites or on

ancient mines (dating back to Roman age; Lefèbvre<sup>n</sup>, pers. comm.) while recent populations occur on industrial polluted sites. The study of the reproductive success variation within and between populations was performed in different habitats on five populations representing three ancient and two recent populations. The variation of two particular reproductive parameters (seed set and germination percentage) at larger scale was performed in 11 populations representing five recent populations (range of size: 159 m<sup>2</sup> to 32242 m<sup>2</sup>), and six ancient ones (range of size: 0.4 m<sup>2</sup> to 5815 m<sup>2</sup>).

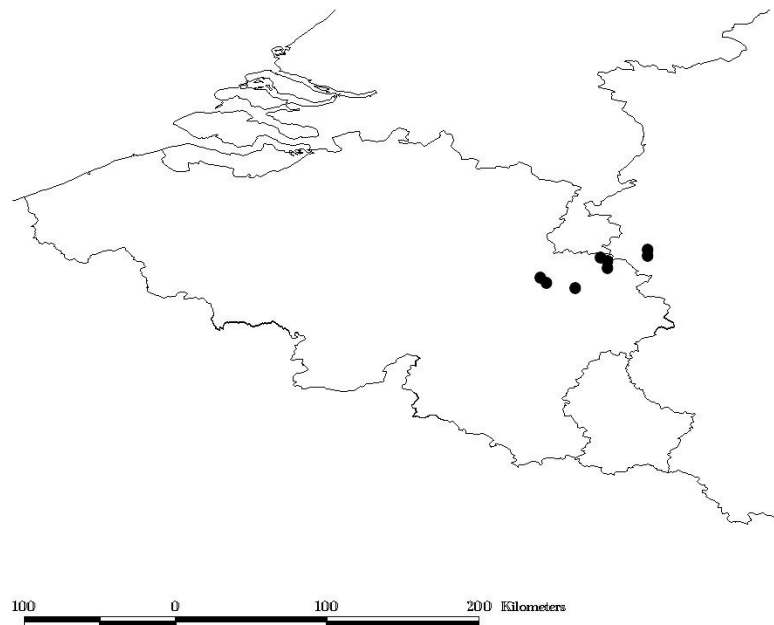


Fig. 3.1: Distribution of *V. calaminaria*. Each point represents area where *V. calaminaria* populations are found.

### 3.2.2 *Reproductive success variation within population*

In each population, vegetation facies were a priori identified on the basis of the vegetation physiognomy. In the different facies (2 per population and three in one population), two transects were established. The vegetation structure was characterized by the linear cover of 7 vegetation stratas along the transect: trees (% tree), shrub (% shrub), herbaceous higher than 30 cm (% herb>30), herbaceous lower than 30 cm (% herb<30), lichen (% lichen), moss (% moss) and bare ground (% bare ground). In each transect, the cover of *V. calaminaria* was estimated every meter in 0.25 m<sup>2</sup> quadrat by the point contact method (Kent and Coker 1992). Cover was used as a density measure. Four quadrats of 0.25 m<sup>2</sup> were permanently marked: two quadrats with high density of *V. calaminaria*

<sup>n</sup> Professeur Claude Lefèbvre, ULB, Faculté des Sciences, Unité de Génétique et écologie végétale.

(corresponding to the two quadrats with the highest density in transect) and two with intermediate density (corresponding to two quadrats with a density close to mean transect density). Each beginning month, from June to October 2004, we noted the flower density (number of flowers in the quadrat) and the fructification percentage (number of fruits on ten flowers marked per quadrat). We also estimated the fruit density (potential number of fruits per quadrat) by multiplying the density of flowers by the fructification percentage. In June and September, up to three mature fruits (among fruits of the ten marked flowers) were sampled in each quadrat and well-developed seeds were counted to determine seed set.

### 3.2.3 *Reproductive success variation at large scale*

Two parameters were used as reproductive success measurements: the seed set (number of seeds per fruit) and the germination percentage. For the seed set, twenty mature fruits were collected in each of the 11 selected populations in July and September 2004. Fruits were sampled along transects every 2-3 meters, a distance considered as sufficient to avoid sampling the same individual twice because of clonality (Chapters 4 and 5). Well-developed mature seeds were then counted to determine the seed set. For the germination percentage, seeds were subsequently collected on open mature capsules in the 11 selected populations. Seeds were placed in Petri dishes on a filter paper humidified with distilled water. Petri dishes were then placed in a conditioned room at 22°C with a 16 hours light period. Two treatments were performed: a fresh seeds treatment (i.e., Petri dishes are directly placed in the conditioned room) and a stratified seeds treatment (i.e., Petri dishes are placed in the dark at 4 °C during 4 months before being placed in the conditioned room). Two sets of 11 Petri dishes (1 dish/population) were used: one with fifty seeds/dish for the fresh seeds treatment and one with seventy seeds/dish for the stratified seeds treatment.

### 3.2.4 *Statistical analysis*

In relation to reproductive success experiments at small scale, a Principal Component Analysis (PCA) was performed with XLSTAT ver.6.0 to synthesise the vegetation structure. Pearson correlations between mean density of *V. calaminaria* in the facies and the coordinate of the facies along the first two axis of the PCA were used to test the possible influence of the vegetation structure on the density of *V. calaminaria*. We further analysed the density variation (with logarithmic transformation of the data) with a hierarchical three-way ANOVA (transects nested within facies nested within sites) to test for difference between sites or facies. Subsequent Tukey-tests were used for pairwise mean comparisons.



In order to study the spatial and temporal variation of the flower density and fructification percentage, a hierarchical crossed four-way ANOVA was used. The three hierarchical spatial factors (transects nested within facies nested within sites) were all crossed with the temporal month factor. When the interaction month\*sites was significant, hierarchical three-way ANOVA were also realised month by month. If the conditions of application for the ANOVA were not verified (variance equality), ANOVA on log-transformed data were used. Subsequent Tukey-tests were used for pairwise mean comparisons when necessary. For the seed production in quadrat, a five-way hierarchical (quadrats nested within transects nested within facies nested within sites) crossed (period with all hierarchical factors) ANOVA was performed in order to test differences between the two periods (June-September), between sites and facies. We then tested a possible effect of *V. calaminaria* density on flower density and an effect of flower density on fructification percentage throughout Spearman correlation. The effect of fruit density and fructification percentage on the seed production was also tested by Spearman correlations in order to test competition effect on seed production.

In relation to the reproductive success variation at large scale, differences between the two periods (June-September), between sites and between recent and ancient populations for the number of seeds/fruit was tested by a three-way hierarchical ANOVA (site nested within “site type” nested within period). Difference in mean germination percentage between stratified and non stratified seeds was tested by paired Student t-test. Differences between population germination percentages were tested by a Chi-squared tested for proportion difference. Difference between mean germination percentages of ancient and recent sites was tested by a two-way ANOVA (sites nested within “type of site”). For the two reproductive success parameters, Spearman correlation was used to test for a relation with population size ( $n = 11$ ) (Bizoux *et al.* 2004) and the IFM indice ( $n = 11$ ) of population connectivity in landscape (for population  $i$ :  $I_i = \sum e^{-d_{ij}} \cdot A_j$  where  $A$  is the surface of the sites and  $d$  the distance to other sites; Hanski 1994, Moilamen and Nieminen 2002). Correlation between reproductive success measures and heavy metal (Zn, Pb, Cd) concentrations or other soil parameters (Ca, Mg, pH, K and ratio Pb/Ca, Zn/Ca and Ca/Mg) were tested ( $n = 8$ ) with Spearman correlations. Mean soil concentrations and ratio (Pb/Ca, Zn/Ca) were known from a previous study (Bizoux *et al.* 2004). Correlation between soil parameters and germination percentage was also tested because heavy metals may have an indirect effect on germination percentage throughout impact on seed quality.

All ANOVAs and correlation analysis were performed with MINITAB ver. 13.20.

### 3.3 Results

#### 3.3.1 Habitat characterization

All facies were dominated by the herbaceous strata inferior to 30 cm height (> 50 %) except two facies. The first two axis of the PCA respectively explained 31 % and 25 % of the vegetation structure variation (Fig. 3.2). The first axis was mainly positively correlated with % herb>30 and negatively correlated with % bare ground and % moss. The second axis was mainly positively correlated with % herb<30.

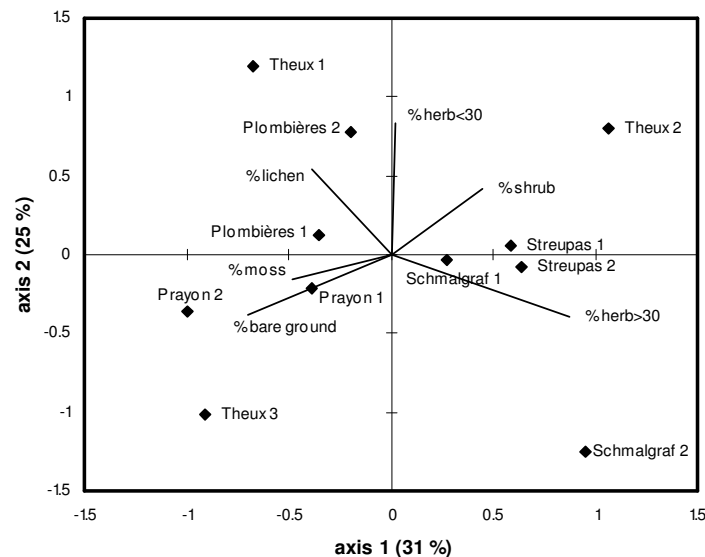


Fig. 3.2: Facies-vegetation structure biplot, along axis 1 and 2, from the ACP based on the 7 vegetation stratas and 11 facies identified in 5 populations of *V. calaminaria*. The 6 vegetation stratas were: shrub (% shrub), herbaceous superior to 30 cm height (% herb>30), herbaceous inferior to 30 cm height (% herb<30), lichen (% lichen), moss (% moss) and bare ground (% bare ground).

#### 3.3.2 Spatial and temporal variation of reproductive success at small scale

No correlation was found between mean *V. calaminaria* density and the coordinate of the facies in the PCA based on vegetation structure indicating no obvious effect of the vegetation structure on the species density. ANOVA (Fig. 3.3, Table 3.1) showed no significant difference in density between the five populations (Range: 9.9 % -18.3 %,  $P = 0.895$ ) while significant difference appeared between the different facies (Range: 7.5 % - 29.3 %,  $P = 0.009$ ) but also between transects (Range: 4.7 % - 30.2 %,  $P = 0.023$ ). Following mean pairwise comparisons, this significant difference was only due to difference between facies 1 of Prayon and the facies 2 of Schmalgraf (Tukey test).

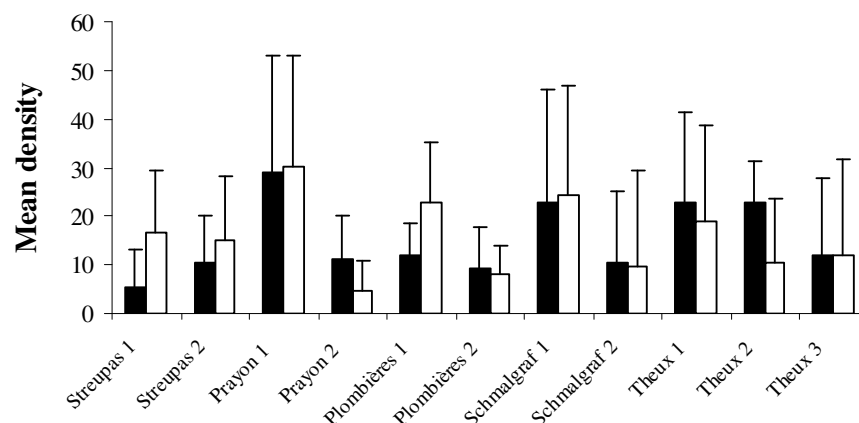


Fig. 3.3: Mean density (cover percentage) of *V. calaminaria* in five populations. Each couple of bars represents the two transects of one facies and whiskers represents standard deviation.

For the flower density (Fig. 3.4, Table 3.1), we found an important variation between the different months (Range: 7.2 – 73.1 flowers/m<sup>2</sup>,  $P < 0.001$ ). The difference between sites was also marginally significant (Range: 15.6 – 73.6 flowers/m<sup>2</sup>,  $P = 0.060$ ). The difference between facies was less important (Range: 1.9 – 25.6 flowers/m<sup>2</sup>,  $P = 0.073$ ) and the difference between transects was highly significant (Range: 2.3 – 23.8 flowers/m<sup>2</sup>,  $P < 0.002$ ) (Table 1). In June and July, the species displayed significantly higher flower density than in the other months and in October significantly lower flower density was found as compared to other months (Tukey test).

Table 3.1: Comparison of spatial and temporal variation of density, flower density, fructification percentage and seed set in five *V. calaminaria* populations (hierarchical ANOVA). DF, F and  $P$  represent respectively the degree of freedom, the F Snedecor value and the probability of the ANOVA.

Source of variation	Species density			Flower density			Fructification rate			Seed set		
	DF =	F =	$P =$	DF =	F =	$P =$	DF =	F =	$P =$	DF =	F =	$P =$
dates	/	/	/	4	50.51	0.000	4	10.66	0.000	1	0.42	0.519
sites	4	0.26	0.895	4	4.16	0.060	4	2.80	0.119	4	7.12	0.015
dates*sites	/	/	/	16	1.52	0.090	16	1.81	0.029	4	1.19	0.314
facies (sites)	6	5.08	0.009	6	2.70	0.073	6	1.79	0.189	6	0.71	0.649
transect (sites facies)	11	2.05	0.023	11	2.71	0.002	11	1.49	0.136	11	2.50	0.011
Quadrat Error	/	/	/	/	/	/	/	/	/	58	1.33	0.072
	370			398			291			261		

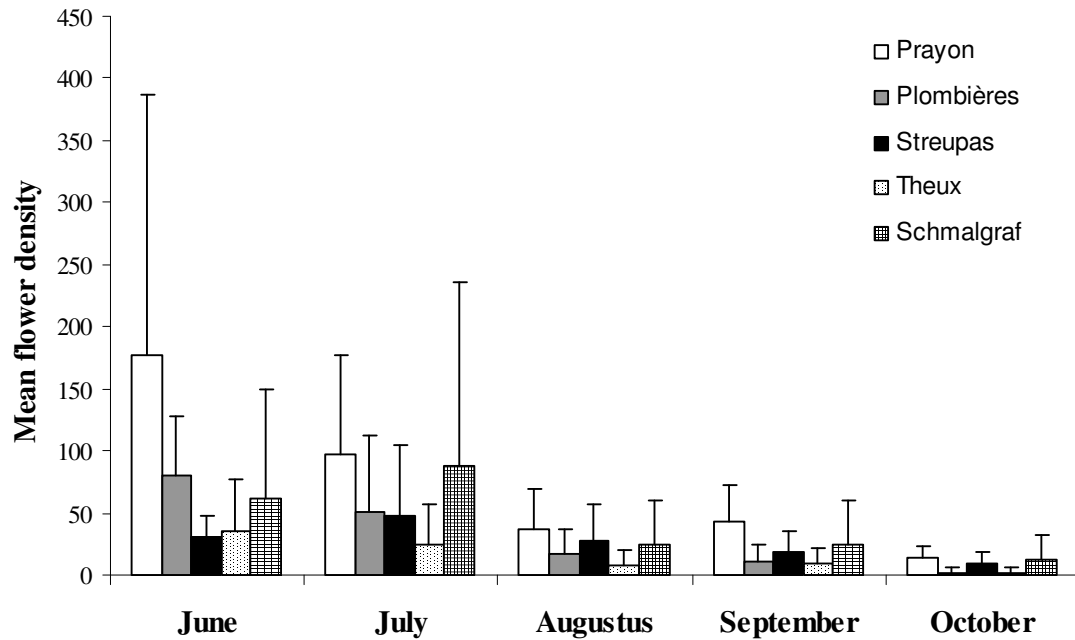


Fig. 3.4: Variation of mean flower density (number of flowers/m<sup>2</sup>) among the different months of the flowering period in five *V. calaminaria* populations. Whiskers represents standard deviation.

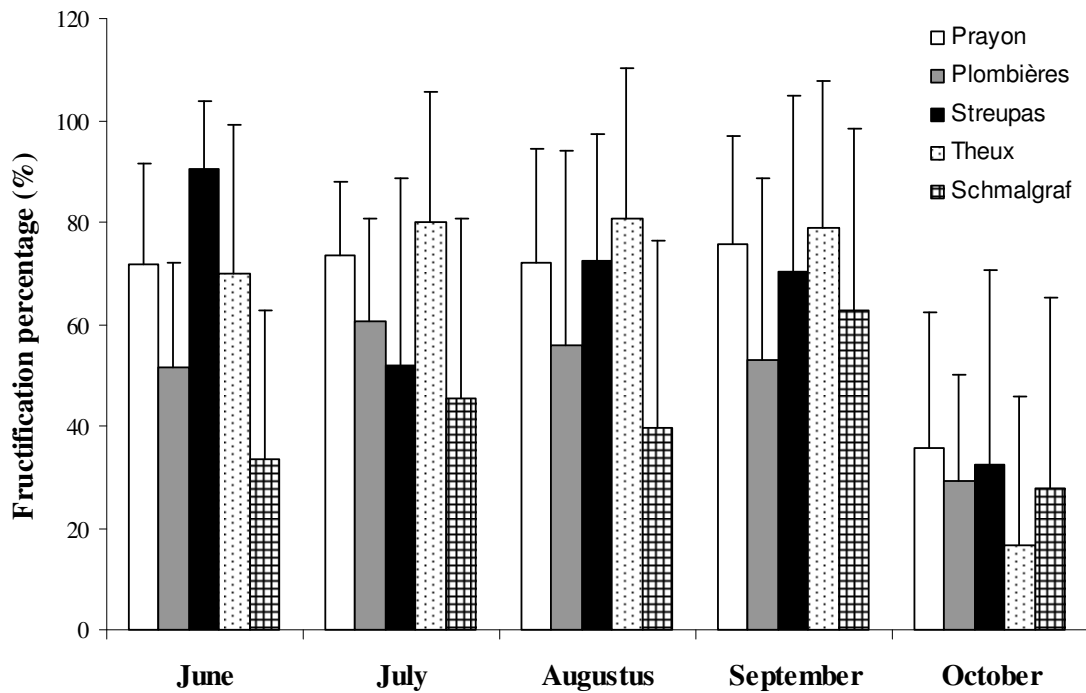


Fig. 3.5: Variation of mean fructification percentage (%) among the different months of the flowering period in five *V. calaminaria* populations. Whiskers represents standard deviation.

For the fructification percentage (Fig. 3.5, Table 3.1), we observed an important and significant variation between months (Range: 30.9 % - 69 %,  $P < 0.001$ ) but not between sites (Range: 42.4 % - 74.4 %,  $P = 0.119$ ). No significant difference was found between facies (Range: 28.2 % - 79 %,  $P = 0.189$ ) and between transects (Range: 16.3 % - 91 %,  $P = 0.136$ ). The difference between months was only due to significant lower fructification percentage in October (Tukey test). The month\*sites interaction was significant ( $P = 0.029$ ), which means that the evolution of fructification percentage between the months differs according to site. Analysis was also performed month by month. The hierarchical three-way ANOVA showed a significant difference between the site in June ( $P = 0.017$ ). In Augustus, there was also a significant difference between facies ( $P = 0.021$ ).

For the seed set, the ANOVA (Table 3.1) showed no significant difference between June and September (Range: 16.7 - 18.5 seeds/fruit,  $P = 0.61$ ), significant difference between sites (Range: 10.9 - 25.2 seeds/fruit,  $P = 0.003$ ) and no difference between facies (Range: 9.9 - 25.8 seeds/fruit,  $P = 0.65$ ). The period\*site interaction was not significant ( $P = 0.314$ ), indicating that the difference between sites was similar for the two periods.

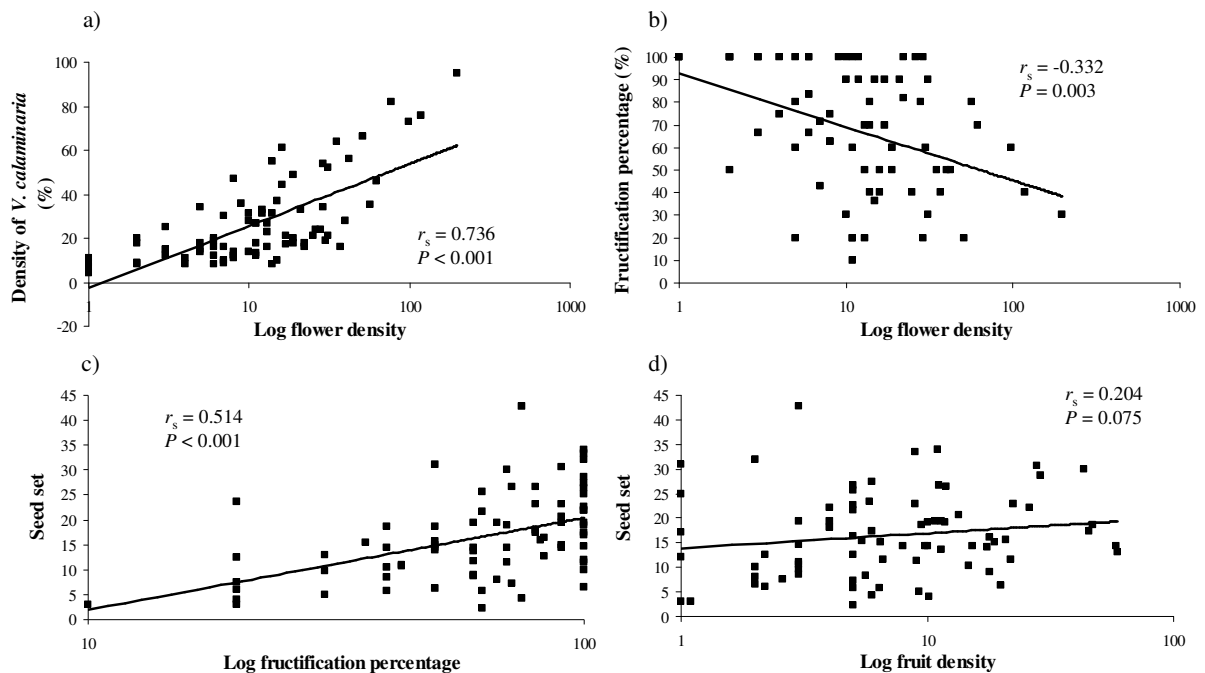


Fig. 3.6: Correlation between a) density of *V. calaminaria* and flower density; b) flower density and fructification percentage; c) fructification percentage and seed set; d) fruit density and seed set (data from June).

We found a significant positive correlation between the density of *V. calaminaria* in June and the flower density in June ( $r_s = 0.736$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 3.6 a) and a negative significant correlation between the flower density per quadrat and the fructification percentage for June ( $r_s = -0.332$ ,  $P = 0.003$ , Fig. 3.6 b) and July ( $r_s = -0.210$ ,  $P = 0.063$ ) but not for the other months. A significant positive correlation was also found between the fructification percentage and the seed set in June ( $r_s = 0.514$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 3.6 c) but not in September ( $r_s = 0.086$ ,  $P = 0.524$ ). No significant correlation was found between the fruit density and the seed set ( $r_s = 0.204$ ,  $P = 0.075$ , Fig. 3.6 d) in June and September.

### 3.3.3 Reproductive success variation at large scale

The mean seed set was 20 (SD = 10.5) in June and 20.3 (SD = 10.2) in September (Fig. 3.7 a), and the difference was not significant (ANOVA,  $P = 0.895$ ). The ANOVA test indicated significant differences in mean seed set between ancient (means  $\pm$  SD = 16.94  $\pm$  9.06) and recent (means  $\pm$  SD = 23.99  $\pm$  10.51) populations ( $P = 0.030$ ), as well as among all populations (range: 12.43 – 27.58,  $P < 0.001$ ) for the two periods. The correlation test between the mean seed set of the different sites between the two period was significant ( $r_p = 0.926$ ,  $P < 0.001$ ). No correlations were found between mean seed set and population size (June:  $r_s = 0.159$ ,  $P = 0.640$ ; September:  $r_s = 0.096$ ,  $P = 0.780$ , Fig. 3.8 a).

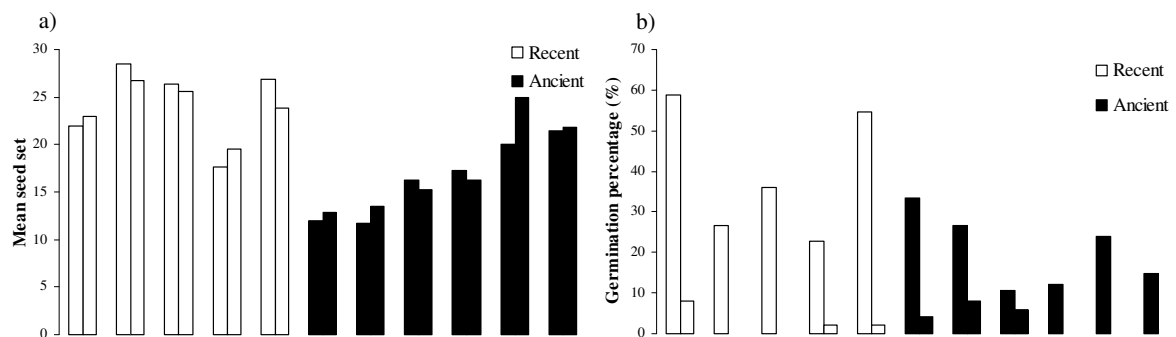


Fig. 3.7: a) Mean seed set for 11 *V. calaminaria* populations. Each population is represented by two bars. The first one represents the seed set for June and the second one, seed set for September. b) Germination percentage for 11 *V. calaminaria* populations. Each population was represented by two bars. The first one represents germination percentage after stratification and the second one, germination percentage without stratification.

There was a positive correlation between the patch connectivity index and the mean seed set (June:  $r_s = 0.827$ ,  $P = 0.002$ ; September:  $r_s = 0.673$ ,  $P = 0.024$ , Fig. 3.8 b). No correlations were found with soil elements conditions except for Zn/Ca ratio (June:  $r_s = -0.833$ ,  $P = 0.010$ ; September:  $r_s = -0.571$ ,  $P = 0.139$ ) and Ca/Mg ratio (June:  $r_s = 0.929$ ,  $P = 0.001$ ; September:

$r_s = 0.762$ ,  $P = 0.028$ ). The mean germination percentage per population (Fig. 3.7 b) was 2.73 % (SD = 3.3) for fresh seeds and 29.1 % (SD = 15.8) for stratified seeds, the difference being significant ( $t$ -test,  $P < 0.001$ ). We found an important variation of the germination percentage between populations (Range for stratified seeds: 10.6 – 57.9, Chi-square test:  $P < 0.001$ ). The recent populations significantly displayed higher germination percentages (mean  $\pm$  SD =  $39.7 \pm 16.3$ ) than ancient populations (mean  $\pm$  SD =  $20.2 \pm 9.1$ ) (ANOVA,  $P = 0.033$ ). There was a positive marginally significant correlation between germination percentage and population size ( $r_s = 0.580$ ,  $P = 0.061$ , Fig. 3.8 c), but not between germination percentage and patch connectivity index ( $r_s = 0.435$   $P = 0.150$ , Fig. 3.8 d). A positive significant correlation was observed between germination percentage and Ca/Mg ratio ( $r_s = 0.857$ ,  $P = 0.007$ ) and a negative but not significant correlation with the Zn/Ca ratio ( $r_s = -0.524$ ,  $P = 0.160$ ).

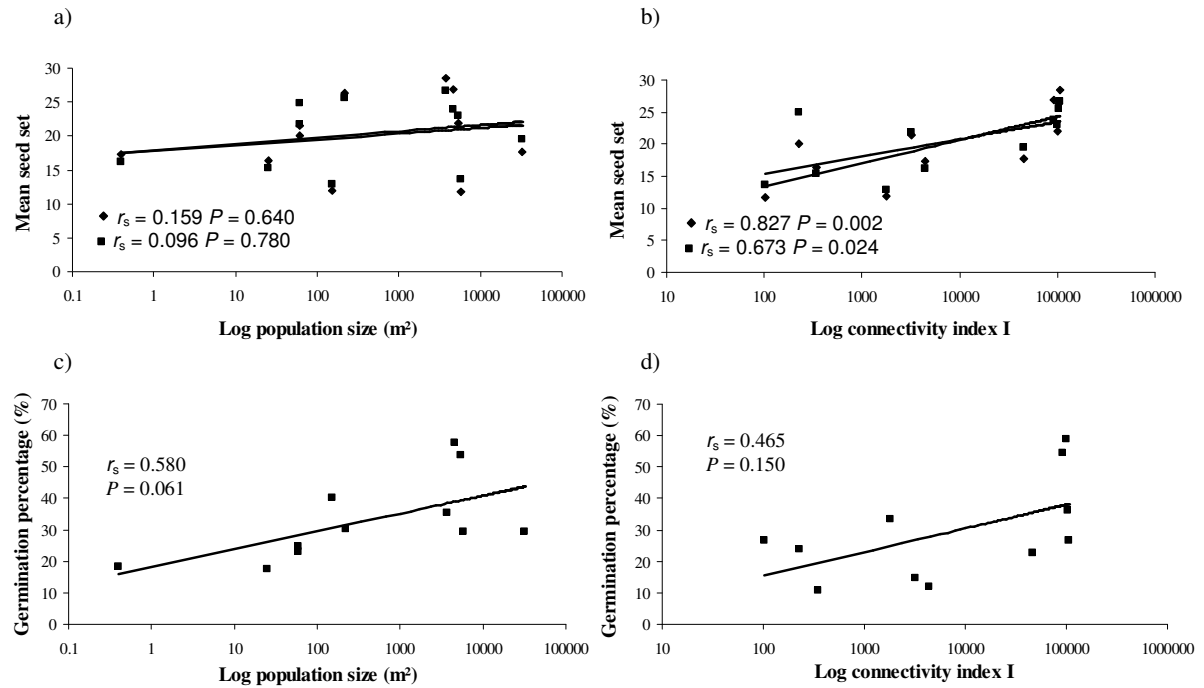


Fig. 3.8: Correlation between a) population size and seed set for June (♦) and for September (■); b) connectivity index and seed set for June (♦) and for September (■); c) population size and germination percentage; d) connectivity index and germination percentage.

### 3.4 Discussion

#### 3.4.1 *Effect of vegetation structure and density on the spatial reproductive success variation*

Our study provides the first description of the reproduction success of the endemic metallophyte, *V. calaminaria*. Variation observed in the vegetation structure did not influence either the density, or the reproductive success of the species. In contrast, we found an important monthly variation in the flower density. Temporal variation of the fructification percentage was lower and only due to significant decreases in October, probably as a result of a diminution of the pollinator activities. In the same way, we did not find any differences in seed set between months. Thus, the temporal variation of reproductive success was only due to variation in flower density that consequently influences total reproductive output (total number of seed produced by square meter) in the populations.

Plant density was recognized to influence reproduction success in various species (Harper 1977, Lande 1988, Begon 1990, Roll *et al.* 1997). Decreased plant density might decrease the reproductive success, a feature known as the Allee effect (Lande 1988, Begon 1990, Oostermeijer *et al.* 2003). Low density is likely to modify pollinator behaviour resulting in less pollinator visits and leading to a decrease in fructification percentage or seed set (Sih and Baltus 1987). In contrast, individual reproductive success might decrease with increasing local density due to intraspecific competition for resources (e.g. Harper 1977). We found a positive effect of the plant density on the flower density and no effect of fruit density on seed set. This indicates no important competition for resources. This could be the result of high-density patch occurring when resources are more abundant inhibiting possible effect of competition (Kennedy and Gray 1993, Roll *et al.* 1997). However, we found a negative effect of the flower density on the fructification percentage in June and July when the flowers were very abundant. This is in contrast with the expectations of an Allee effect and the finding by several authors (Sih and Baltus 1987, Agren 1996, Roll *et al.* 1997, Wolf and Harrison 2001) that found an increase of reproductive success with increase of local density likely due to a increase of pollinator visitation. *Viola* species are recognized to attract pollinators by pollen or nectar resources (Beattie 1971 and 1972, Freitas 2003). The possible explanation for the pattern observed in our study may simply be that a high flower density leads to lower chance for a single flower to be pollinated because of increased competition between flowers for pollen transport by pollinators. Also, in dense flower patches, pollinators could promote, by short distance flights, pollen transfer between flowers of linked genetic individuals (30 cm,



chapitre 5) and thus decrease fructification percentage and number of seed per fruit due to a diminution of pollen quality (See Roll *et al.* 1997 or Hendrix and Kylh 2000).

### 3.4.2 Causes of reproductive success variation at large scale

Reed and Frankham (2003) and Reed (2005) found in their reviews that population size and heterozygosity (genetic diversity) were generally positively and significantly correlated with population fitness. In our study, we did not find any correlation between population size and seed set; only a positive tendency between population size and the germination percentage was observed. Thus, this relation (between germination percentage and population size) suggests that species with scattered populations may suffer of habitat reduction or destruction (Wolf and Harrison 2001, Leimu and Mutikainen 2005). Furthermore, differences in seed set or germination percentage can largely be influenced by non genetic factors such as limited resources (poor habitat quality) and/or impact of heavy metal on plant development (plants grow smaller in presence of high heavy metal concentration) and/or low availability of pollen (lack of pollinators or lack of pollen exchange). We found no impact of heavy-metal concentrations on fitness but a negative effect of the Zn/Ca ratio, particularly on seed set. The ratio of heavy metal concentration on Ca concentration is often used as measure of soil toxicity because  $Zn^{2+}$  may enter in competition with  $Ca^{2+}$  at the root level (Simon 1975, Brown 2001). It thus appears that soil toxicity negatively influences the reproductive success of *V. calaminaria*. In contrast, we found a positive effect of the ratio Ca/Mg on fitness. Ca/Mg was used by Wolf and Harrison (2001) on serpentine soils (mainly Ni pollution) as a measure of soil fertility. Even if we can not directly transpose this ratio as a fertility measurement on calamine soils, mainly because serpentine sites have generally an excess of  $Mg^{2+}$ , we can conclude to an indirect favourable effect of  $Ca^{2+}$  balance on *Viola calaminaria* fitness.

Several studies have shown the influence of patch and population isolation on plant fitness (Price and Waser 1979, Sih and Baltus 1987, Rathcke and Jules 1993, Broyles *et al.* 1994). These studies underlined the importance of pollinator visitation rate, which depends on pollinator movements and distance between patches and populations. In the same way, the positive correlation observed between population connectivity (IFM index) and the seed set suggests an influence of pollen flow on fitness in *V. calaminaria*. Flowers of *V. calaminaria* are mainly visited by solitary bee, bumblebee, flies (Syrphidae) or butterflies (personal observation). Honeybees can forage in a diameter of up to several km around their beehive (Steffan-Dewenter and Tschardt 1999, Walther-Hellwig and Frankl 2000). Pollen exchange

promoting fitness could be more important between large close populations than between isolated small populations. More studies should explore the relations between fitness, visitation rate of pollinators and pollen limitation in *V. calaminaria*.

### 3.4.3 Conservation implications

We did not detect critical reproduction stage in *V. calaminaria* population. We showed that flower production, fructification percentage and seed set are not limiting factors for the survival of *V. calaminaria* populations (small or large). But, germination percentage was reduced by more than half in small populations. Nevertheless, globally, there is sufficient viable seed production, even in small population, to maintain viable population. We can estimate a potential seed germination (by multiplying, for a site in June, the mean fruit density by mean seed set by germination percentage) of about 40 seeds/m<sup>2</sup> in the worse situation.

We showed that population history (colonization events) could also influence the fitness of a species. Ancient populations significantly displayed lower fitness parameters than newly established populations. The reason why it is the case is not evident but the important geographic and genetic isolation of ancient populations accentuated by extinction and reduction of some of them could negatively influence the fitness of these populations (Wolf and Harrison, 2001). In contrast, rapid demographic extension, more accentuated recent gene flow and creation of recent populations from several sources may have promoted fitness on these populations as found by Leimu and Mutikainen on *Vincetoxicum hirundinaria* (2005). Thus, recent populations appeared to be important for species conservation. Nevertheless, conservation of those sites poses problems because they result from pollution and are generally situated in regions characterized by high density human populations. Thus, it would be interesting to take some measures to improve fitness, especially germination, in some very isolated ancient populations (e.g. Schmalgraf, Theux, Kelmis). For instance, upper soils removal or vegetation burning (Perso. Obs.) could promote germination of the seed bank (Bizoux unpublished) when recruitment was insufficient. It could also be interesting to promote some gene flows (via seeds) between these ancient populations or introduce new genotypes from larger populations before the inbreeding becomes too important in ancient populations.

## **Chapitre 4 : Genetic variation of *Viola calaminaria*, an endemic metallophyte, based on RAPD markers: implication of population structure and history**

Dans les chapitres 2 et 3, nous avons principalement étudié des traits importants de la biologie des populations, comme la taille des populations ou le succès reproducteur. Néanmoins, comme mentionné dans l'introduction générale, les études de variation génétique apportent également des informations précieuses dans le cadre de la mise en place de stratégies de conservation. Elles sont d'autant plus importantes dans le cas des métallobytes où la pression de sélection sévère des métaux peut entraîner une diminution de la diversité génétique. Parallèlement, l'isolement géographique important des populations des métallobytes peut aussi entraîner une différenciation génétique accrue suite à des faibles flux de gènes. En plus, chez *V. calaminaria* en particulier, l'apparition récente de populations en expansion peut avoir modifié la structure de sa variation génétique.

Il apparaît donc primordial d'étudier la variation génétique de l'espèce. Les chapitres suivants y sont consacrés. Ce chapitre étudiera en particulier la variation génétique de l'espèce sur l'ensemble de son aire de distribution en relation avec la structure des populations, la taille des populations et l'histoire de celles-ci. Comme précisé dans le chapitre 1, la technique RAPD sera utilisée.

## Abstract

We investigated the pattern of genetic variation in a rare endemic metallophyte of calamine soils, *Viola calaminaria*, and its close relative *Viola guestphalica*, to determine the local genetic structure of population and infer their history.

Twelve populations from the main range and two isolated populations were examined with RAPDs markers. Mean population genetic diversity ( $H_s = 0.25$ ) was similar to non metallophyte endemic taxa. There were no relationships between population genetic diversity and i) population size ii) environmental heterogeneity measured as variation of heavy metal concentrations in sites. Twenty six percent of the genetic variation was partitioned among populations with low (9 %) but significant differentiation among geographical region.

Recently founded populations exhibited the same level of genetic diversity but lower level of differentiation than ancient populations. Our results did not support the hypothesis that the acquisition of metal tolerance may result in reduced genetic diversity. There was no indication of strong founder effects in recently founded populations. *V. guestphalica* was well differentiated from the *V. calaminaria* populations but there was no strong support for specific taxonomic status. The significance of the results for the conservation of *V. calaminaria* is discussed.

**Key words:** *Viola calaminaria*, genetic variation, natural and anthropogenic populations, RAPD, heavy metals.

---

*Bizoux J-P., Daïnou K., Mahy G.*

*Article soumis dans Plant Systematics and Evolution.*

## 4.1 Introduction

Soils with elevated concentrations of heavy metals (metalliferous soils) occur worldwide naturally, or either as a result of human activities such as mining, aerial deposition or industrial processes. Because of their phytotoxicity, they represent very restrictive habitats for plants (Antonovics *et al.* 1971, Ernst 1990, Brown 2001). In general, metalliferous sites are of small size and geographically isolated from each other within a landscape matrix with normal background metal concentrations (Wolf 2001). They provide outstanding examples of micro-evolution and speciation processes due, on the one hand, to the severe selection pressure induced by heavy metals and, on the other hand, to possible founder effects and genetic drift induced by the insularity of these habitats (Ernst 1990, Lefèbvre and Vernet 1990, Mengoni *et al.* 2000). As a result, metalliferous sites may host rare, ecologically endemic taxa adapted to high levels of heavy metals (Antonovics *et al.* 1971, Ernst 1990, Lefèbvre and Vernet 1990, Brown 2001, Whiting *et al.* 2004).

Such rare taxa with small, fragmented and often threatened populations are a priority for biodiversity conservation in regard to the species extinction crisis (Schemske *et al.* 1994, Primack 1998). In addition rare metallophyte endemic taxa are worth conserving due to their potential use in phytoremediation (Antonovics *et al.* 1971, Whiting *et al.* 2004). Study of the population genetic structure of rare species is an integral part of the knowledge necessary to develop conservation strategy (Lande 1988, Haig 1998). Genetic variation within species is affected by a number of factors, such as reproductive mode, breeding system, life-history traits, population history, distribution range and selective constraints (Hamrick and Godt 1996, Nybom and Bartish 2000). Consequently, knowledge of the current genetic structure allows inference about past and present population processes. Small populations of narrowly distributed species with naturally scattered habitats are expected to display low inter population gene flow and to be more prone to genetic drift and inbreeding (Ellstrand and Elam 1993). Endemic and rare species are therefore expected to exhibit a higher proportion of variation between populations and lower total genetic diversity than widespread species (Ellstrand and Elam 1993, Zawko *et al.* 2001).

In metallophyte species, additional factors may be important in shaping population genetic structure. Major founder effect due to the selection of a limited number of genotypes under severe selection pressure, for metal tolerance, may reduce the genetic diversity of metallophyte taxa (Vekemans and Lefèbvre, 1997). In contrast, because metalliferous sites are generally heterogeneous at small spatial scale for several ecological factors (metal toxicity,

drought), genetic variation may be more important within metallophyte populations than expected under the founder effect hypothesis (Krüger *et al.* 2002, Mattner *et al.* 2002, Pluess and Stöcklin 2004b). This may be true also for neutral genetic marker as environmental heterogeneity should promote the selection of a number of different adapted genotypes. This is supported by several studies on plant populations that have revealed a fine-scale intra-population genetic structure, based on neutral genetic marker, associated with habitat variation (Linhart and Grant 1996, Lönn *et al.* 1996, Li *et al.* 2000, Prentice *et al.* 2000, Van Rossum *et al.* 2004).

In the last centuries, in Europe, human activities such as deposition of metalliferous slags, mining, aerial deposition or other industrial processes have increased habitat availability for naturally metal tolerant species and provided opportunities for colonization. Such a modification of the habitat spatial structure may significantly influence the pattern of gene flow and the resulting genetic structure. Comparative studies of old sites with that of younger metalliferous sites can give significant insights into processes of ecological radiation under special conditions of harsh environment (Baumbach and Hellwig 2003).

In East Belgium and West Germany, metalliferous sites consist of calamine soils exhibiting high concentrations of zinc, cadmium and lead (Lambinon and Auquier 1964, Duvigneaud 1982). These sites host a number of metallophytes at various taxonomic ranks (Lambinon and Auquier 1964, Duvigneaud 1982). Of all these taxa, *Viola calaminaria* (Gingins) Lej. is the only species endemic to calamine sites with a restricted geographical range limited to Eastern Belgium and Western Germany. A second species, *V. guestphalica*, represented by a single population located in central Germany is often distinguished from *V. calaminaria*. From the end of the 19<sup>th</sup> century to the 1970s, new *V. calaminaria* populations have appeared in the vicinity of Liège as a result of increasing habitat availability caused by industrial pollution (Bizoux *et al.* 2004). However, more recently, the number and size of populations of metallophytes have decreased because some sites have been rehabilitated (Duvigneaud 1982) so that potential problems for populations and metapopulations survival could occur.

In this study, we examined the pattern of genetic variation in populations of *V. calaminaria* and the closely related population of *V. guestphalica* in relation to population spatial structure and recent history. Our specific aims were: (i) to assess the genetic structure of the species at the scale of its distribution range in order to evaluate the genetic diversity of a strict metallophyte species and to identify conservation units; (ii) to examine the influence of population size and recent colonisation events on population genetic structure in a taxon

growing in a harsh environment; (iii) to assess the differentiation between the two related taxa *V. calaminaria* and *V. guesphalica*.

## 4.2 Material and methods

### 4.2.1 Plant material

*V. calaminaria* is a perennial pansy with a prostrate habit reproducing mainly from seeds and exhibiting also a limited vegetative propagation by means of rhizomes and stolons. Presumably allogamous, *V. calaminaria* is endemic to calamine outcrops and has a narrow distribution that includes the east of Belgium and the vicinity of Aachen (west of Germany). In Belgium, only twenty-three populations are currently known (Bizoux *et al.* 2004). On the basis of cytological criteria, *V. calaminaria* is generally considered as an autotetraploid ( $2n = 52$ ) derived from *Viola tricolor* L. subsp. *subalpina* Gaud. ( $2n = 26$ ) during the ice age (Heimans 1961, Kakes 1979) or derived more recently from *Viola tricolor* L. (Ernst cited in Kakes and Everards 1976). In contrast, Rostanski (2003) has argued that *V. calaminaria* possess  $2n=48$  chromosomes and is thus related to *Viola lutea*. According to Kakes (1977) and Ernst (1990), two subspecies should be recognised: *Viola calaminaria* subsp. *calaminaria* Lej. and *Viola calaminaria* subsp. *westfalica* (Lej.) Ernst, the latter with purple flowers being restricted to Germany. Other authors considered them as two distinct species: *Viola calaminaria* and *Viola guesphalica* Nauenburg (Hildebrandt *et al.* 1999, Rostanski 2003). *Viola guesphalica* Nauenburg, is restricted to a single population at Blankerode (Central Germany). Whatever its origin, *V. calaminaria* is considered as a rare calamine-endemic taxon with no equivalent non metallicous populations and must have an original genetic pool. Twelve populations of *V. calaminaria* were sampled in Eastern Belgium and in the vicinity of Aachen (west of Germany) (main distribution range of the species) representing four geographic regions (Fig. 4.1). The regions are: 1) vicinity of Liège (P1, P2, P3, P4); 2) Theux (T1, T2); 3) vicinity of La Calamine (K1, K2, K3, K4) and 4) vicinity of Stolberg (S1, S2). Two isolated population at Auby (F) and Blankenrode (*V. guesphalica*), that lie 200 and 230 km respectively from the main distribution range, were also sampled. Leaves were collected from fifteen individuals per population along transect every 2-3 meters a distance between the samples sufficient to avoid sampling the same individual (Bizoux, unpublished). The population size of nine of the selected populations was known from a previous study (Bizoux *et al.* 2004). Because the species is clonal and individuals are not identifiable on the field, area covered by the species within each site was used as a surrogate of population size.

Area covered was estimated as the combination of total area of *V. calaminaria* patches and species density within patches (range: 0.4 m<sup>2</sup> -32242 m<sup>2</sup>; Table 4.1). Mean soil metal concentration and its variability (coefficient of variation) for Zn, Pb, Cd, Zn/Ca and Pb/Ca were also known for six populations (P3, P4, P1, P2, T1, K1) (Table 4.2). Details of methods and results for those analyses are reported in Bizoux *et al.* (2004).

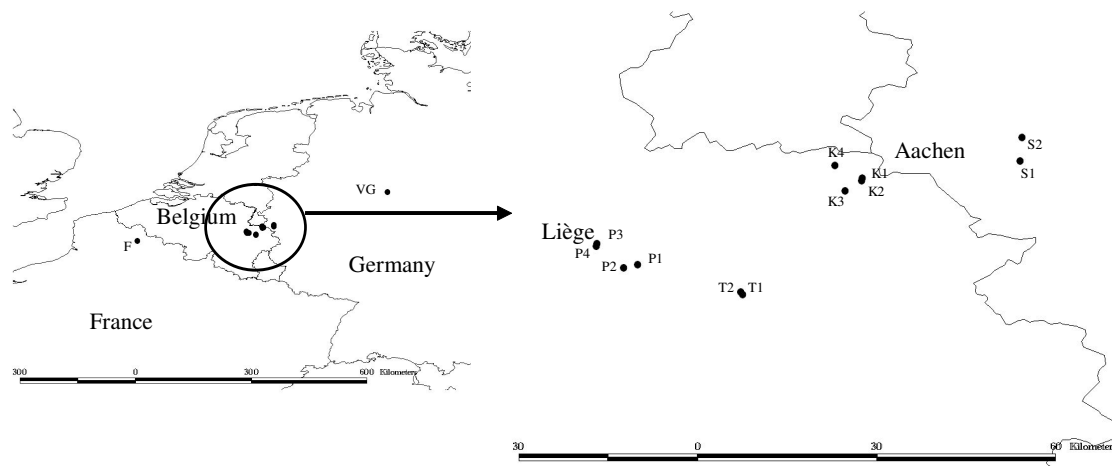


Fig. 4.1: Location map of sampled populations of *Viola calaminaria* and *Viola guesstphalica* (VG)

#### 4.2.2 DNA extraction and RAPD amplification

DNA was extracted from frozen leaves using the DNeasy<sup>TM</sup> (Qiagen, Germany) extraction kit. DNA amplification reactions were performed in 25 µl total volume containing: 1X buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each Dntps (Invitrogen, UK), 200 µg/ml of BSA (Aldrich, USA), 1 U of Taq Dna polymerase (Amersham Bioscience, UK), 10 pmol of primers, 20-30 ng of template DNA. Amplifications were performed in a PTC 200 (MJ Research: Biozym) for an initial denaturing step of 2min at 95°C, 44 cycles of 20 sec at 94°C, 60 sec at 36°C, 60 sec at 72°C and a final step of 10 min at 72°C before cooling at 4°C. Controls were included to detect any possible contamination. Amplification products (12 µl) were subjected to electrophoresis in 1.8 % (w/v) agarose gels (containing ethidium bromide) in 1 x TAE buffer and then detected by viewing under UV light, and photographed. Molecular weights were estimated by reference to a 100 base-pair DNA Ladder (GeneRuler, Fermentas GmbH, Germany). Eight primers (Operon technologies, Germany) were selected from an initial survey of 42 primers: OPA-2, OPA-10, OPB-12, OPH-3, OPL-1, OPL-2, OPM-15 and OPT-15. Band selection was based on a repeatability test. DNA amplification for twenty individuals was repeated twice and only reproducible bands were considered for analysis.



### 4.2.3 Data analysis

The amplification products for the different samples were screened for presence/absence (1/0) of the 45 selected bands. Bands of identical size amplified with the same primer were considered to be homologous.

Genetic population diversity ( $H_s$ ; Bayesian average heterozygosity) was computed with Hickory ver. 1.0 and compared between populations on the basis of the confidence interval value obtained by the Bayesian method. The relationships between genetic diversity and (1) population size ( $n=9$ ), (2) mean heavy metal concentration ( $n=6$ ), (3) variation (c.v.) of heavy metal concentration ( $n=6$ ) were tested with Spearman correlations (Table 4.2).

Global population differentiation was estimated by  $F_{st}$  with Hickory ver 1.0 (Holsinger *et al.* 2002). Bayesian approach based on MCMC procedure allows  $F_{st}$  estimation from dominant markers without assuming Hardy-Weinberg proportions in populations. Four models were run (full model,  $F = 0$  model,  $\theta = 0$  model and  $f$ -free model). The full model was selected on the basis of DIC, pD and Dbar criterions (Holsinger and Wallace 2004). AMOVA (Excoffier *et al.* 1992) was used to partition the genetic variance at three hierarchical levels: within populations, among populations, among geographic groups of population using Arlequin ver 2.00. Significance was tested on the basis of 10000 random permutations (Schneider *et al.* 2000). To examine the relationships among individual populations, an unrooted UPGMA dendrogram of all populations was constructed with Treeview 1.6.6 (Page 1996), from co-ancestry distances (Reynolds *et al.* 1983) calculated by Arlequin. In order to test for isolation by distance, the relationship between pairwise  $F_{st}$  value derived from AMOVA computation and the pairwise geographical distance for all pairs of populations of the main distribution range was tested with a Mantel test, using Arlequin ver 2.00.

To evaluate the level of genetic differentiation of the two isolated populations, Auby (F) and *V. guestphalica* (VG), we computed the  $F_{st}$  value between each of these populations and *V. calaminaria* populations from the main range, considering these last ones as a single genetic pool. We tested whether the difference between  $F_{st}$  values obtained for each isolated population was significant on the basis of the inclusion of the zero value (null hypothesis = no difference) in the confidence interval (CI: 2,5%-97,5%) of the distribution of differences computed by Hickory (Holsinger and Wallace 2004).

We tested whether the level of differentiation among recent populations (P1, P2, P3, P4) was significantly different from the level of differentiation among ancient populations (K1, T1, K3, K4) in the same way. Populations T2 and K2 were not included in this analysis because

of their origins (recent vs ancient) were not certain. Average population genetic diversity ( $H_s$ ) was compared between recent and ancient populations using a student t-test.

### 4.3 Results

Out of the 45 selected bands ranging in size from 475 bp to 1700 bp, only one appeared to be monomorphic. No bands were rejected using the Lynch and Milligan (1994) criteria. Further analyses were performed on the 44 polymorphic bands. No population specific bands were found.

#### 4.3.1 Genetic diversity within populations

Percentage of polymorphic loci ( $P_1$ ) within populations ranged from 39 to 75 % (mean  $\pm$  s.d. =  $59 \pm 9.75$ , c.v. = 16.5%). K3 and T2 had a significant lower percentage of polymorphic loci. The global genetic diversity ( $H_s$ ) at the species level was 0.32. Genetic diversity ( $H_s$ ) of individual populations ranged from 0.21 to 0.29 (mean  $\pm$  s.d. =  $0.25 \pm 0.026$ , c.v. = 10.6 %) (Table 4.1).

Table 4.1: List of *Viola calaminaria* sampled populations with their origin, population size, percentage of polymorphic loci and genetic diversity (CI = Confidence Interval).

	Origin	Population size (m <sup>2</sup> )	Percentage of polymorphic loci ( $P_1$ )	Genetic diversity (Bayesian average heterozygosity) (CI: 2.5% - 97.5%)
P1 (Prayon 1)	Recent	32242	57	0.249 (0.2074 - 0.2867)
P2 (Prayon 2)	Recent	4590	61	0.233 (0.2003 - 0.2654)
P3 (Angleur 1)	Recent	3744	70	0.283 (0.2532 - 0.3142)
P4 (Angleur 2)	Recent	5427	59	0.254 (0.2258 - 0.2840)
K1 (Kelmis 1)	Ancient	0.4	64	0.278 (0.2490 - 0.3061)
K2 (Kelmis 2)		36	61	0.242 (0.2062 - 0.2775)
K3 (Schmalgraf)	Ancient	150	39	0.214 (0.1743 - 0.2488)
K4 (Plombières)	Ancient	5815	57	0.234 (0.1976 - 0.2699)
T1 (Theux 1)	Ancient	25	66	0.291 (0.2543 - 0.3249)
T2 (Theux 2)			41	0.213 (0.1755 - 0.2483)
S1 (Stolberg 1)			64	0.259 (0.2266 - 0.2906)
S2 (Stolberg 2)			55	0.238 (0.2086 - 0.2685)
Means per population			57.8	0.254 (0.2252 - 0.2703)
F (Auby)			75	0.287 (0.2527 - 0.3191)
VG ( <i>Viola guesphalica</i> )			57	0.225 (0.1967 - 0.2554)
<i>Viola calaminaria</i>			98	0.329 (0.309-0.345)

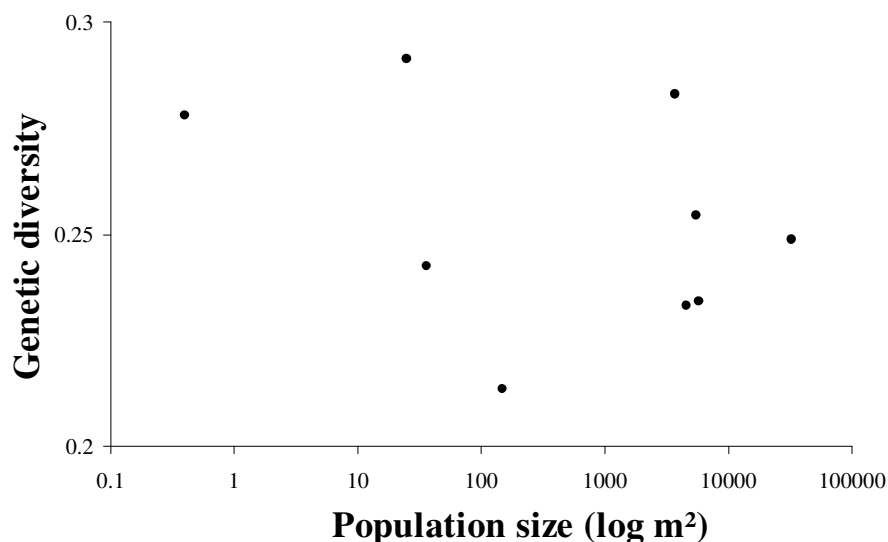


Fig. 4.2: Relationship between population genetic diversity and population size for nine populations of *Viola calaminaria*.

Significant difference appeared between populations: T2 and K3 had lower genetic diversity than population of T1, P3, K1 and F. Genetic diversity was not correlated with population size (Hs:  $r = -0.350$ ,  $P = 0.356$ ; P<sub>i</sub>:  $r = -0.445$ ,  $P = 0.230$ ) (Fig. 4.2). Genetic diversity was also not correlated with mean heavy metal concentration (Table 4.2) nor with the within-population variation of heavy metal concentration, measured by the coefficient of variation within sites (Table 4.2).

Table 4.2: Results of the correlation tests between population genetic diversity (Hs) and 1) mean heavy metal concentrations 2) variation of heavy metal concentrations in six populations.

Soil parameter	Mean heavy metal concentrations		Variation of heavy metal concentrations	
	Range (ppm)	Correlation with Hs	Range (coefficient of variation)	Correlation with Hs
Zn	621,1 - 34950,6	$r = 0.086$ ; $P = 0.870$	0.26 - 1.24	$r = 0.314$ ; $P = 0.540$
Pb	180,6 - 18121,5	$r = 0.371$ ; $P = 0.470$	0.11 - 1.00	$r = 0.371$ ; $P = 0.470$
Cd	1.6 - 38	$r = 0.200$ ; $P = 0.750$	0.15 - 0.62	$r = 0.086$ ; $P = 0.870$
Zn/Ca	1.7 - 13.3	$r = 0.600$ ; $P = 0.210$	0.02 - 1.11	$r = 0.314$ ; $P = 0.540$
Pb/Ca	0.5 - 9.2	$r = 0.029$ ; $P = 0.960$	0.20 - 1.05	$r = 0.600$ ; $P = 0.210$

#### 4.3.2 Genetic differentiation

Variation among the 12 populations from the main distribution range explained 26 % of the total genetic variation ( $F_{st} = 0.260$ ,  $P < 0.001$ ). Highly significant ( $P < 0.001$ ) genetic differences were detected in the analysis of molecular variance among geographic groups and among populations within groups. Out of the total molecular variance, 9 % was due to

differentiation among geographic groups, 20.9 % to differentiation among populations within geographic groups and 70.1 % to within population variation.

Genetic differentiation ( $F_{st}$ ) between populations pairs ranged from 0.061 to 0.522 (mean  $\pm$  s.d. =  $0.287 \pm 0.094$ , c.v. = 32.8 %). All of the 91 pairwise  $F_{st}$  value were significant.

The pairwise values of  $F_{st}$  among the 12 populations of the main distribution area were not correlated with pairwise geographic distances (Mantel test:  $r = 0.037$ ,  $P = 0.380$ , Fig. 4.3).

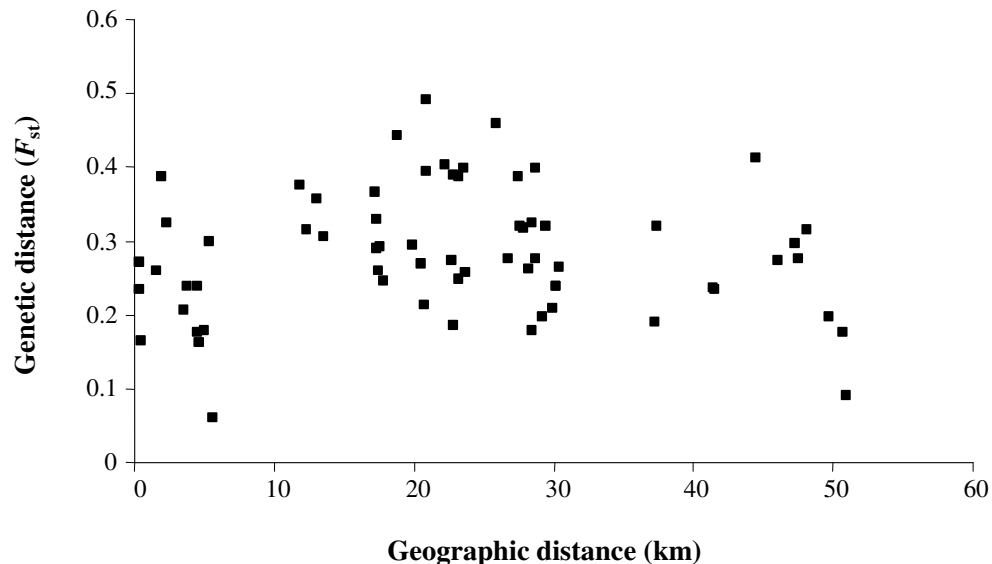


Fig. 4.3: Relationship between pairwise genetic distances and pairwise geographic distances for the 12 populations from the main range of *Viola calaminaria*.

The unrooted UPGMA dendrogram based on Reynold's co-ancestry distance (Fig. 4.4) showed that three populations (VG, K3 and T2) were strongly differentiated. VG (*Viola guestaphalica*) was the most differentiated population in contrast to the other geographically isolated population (F) that clustered with Belgian populations. One group contained all the populations from the Liege region (P1, P2, P3, P4) with an additional population from Stolberg (S2). Populations from other regions did not cluster in a strict accordance with their geographic origin.

One group contained K4 and K1 and the second group contained T1, S1 and K2. The VG population exhibited significantly more differentiation ( $F_{st} = 0.195$ ) than the isolated population from France (F) ( $F_{st} = 0.064$ ) for a similar geographic distance when compared to the central *V. calaminaria* genetic pool (Confidence interval of the distribution of differences: -0.224, -0.052).

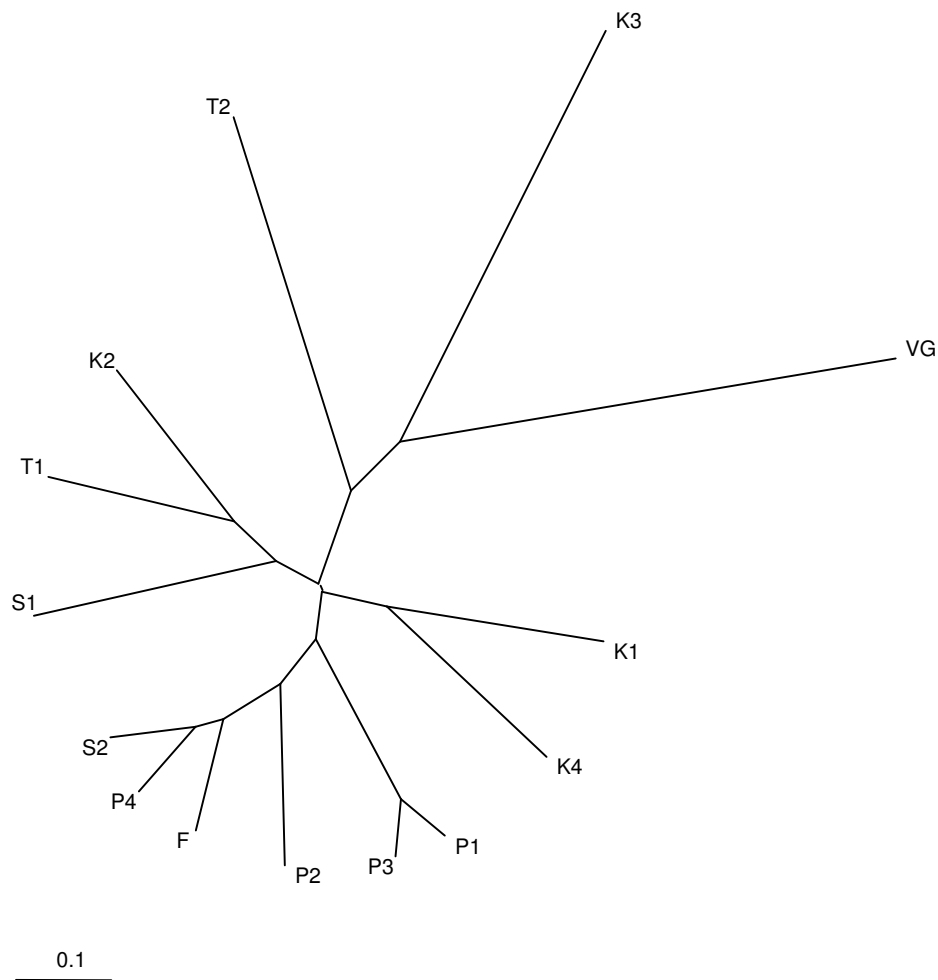


Fig. 4.4: UPGMA radial dendrogram of genetic relationships among *Viola calaminaria* populations based on pairwise Reynold's co-ancestry distances. For abbreviation of population see Table 4.1.

#### 4.3.3 Comparison ancient/recent populations

Average genetic diversity ( $H_s$ ) was not significantly different between ancient (mean  $\pm$  s.d. =  $0.254 \pm 0.036$ ) and recent (mean  $\pm$  s.d. =  $0.255 \pm 0.021$ ) populations (student t-test,  $t = 0,032$ ,  $P = 0.976$ ). Mean genetic differentiation among ancient populations ( $F_{st} = 0.260$ ) was higher than genetic differentiation among recent populations ( $F_{st} = 0.180$ ). This difference (0.08) was almost significant (Confidence interval of the distribution of differences: -0.009, 0.180).

## 4.4 Discussion

In this study we used RAPD to assess the genetic structure of *Viola calaminaria* populations. This technique has the advantage being quick and easy, requiring little plant material, not needing previous knowledge of DNA sequences and having high resolution (Nybom and Bartish 2000). Its main limitations include sensitivity to reaction conditions. This can however be largely overcome by uniform application and replicate runs including controls (Hadrys *et al.* 1992, Lynch and Milligan 1994). It was widely successfully used in studies of genetic diversity and population genetic structure, especially of threatened species.

### 4.4.1 Genetic diversity

Even if care should be taken when comparing estimation of genetic diversity among studies using RAPDs because authors differs in the way to take into account monomorphic loci, in the criteria used to select polymorphic loci and in calculation (Nybom and Bartish 2000), comparisons to non-metallophyte species with similar life-histories were congruent to show that *V. calaminaria* ( $H = 0.254$ ) was not genetically depauperated. *V. calaminaria* genetic diversity was higher than the mean of RAPDs studies for endemic species ( $H = 0.190$ ) and for widespread species ( $H = 0.200$ ) reviewed by Nybom and Bartish (2000) and was similar or higher to values reported for other rare or endemic perennial outcrossing species: *Leucopogon obtectus*;  $H = 0.250-0.320$  (Zawko *et al.* 2001), *Allium aaseae*;  $H = 0.274$  (Smith and Pham 1996), *Iris haynei* and *Iris atrofusca*;  $H = 0.258$  (Arafeh *et al.* 2002), *Antirrhinum microphyllum*;  $H = 0.171$  (Torres *et al.* 2003b), *Astragalus oniciformis*;  $H = 0.150$  (Alexander *et al.* 2004).

Most of the studies of population genetic diversity in relation to metal tolerance have compared tolerant to non tolerant populations of the same species (Ducouso *et al.* 1990, Westerbergh and Saura 1992, Vekemans and Lefèbvre 1997, Mengoni *et al.* 2000, Baumach and Hellwig 2002, Dubois *et al.* 2003). From the available studies there is little indication that, within taxa, plant populations displaying metal tolerance exhibit lower levels of genetic diversity as compared to non tolerant populations. In our case, we assessed the genetic diversity of strict metallophyte taxa with no known non tolerant populations. Our conclusion that endemic metallophyte taxon may exhibit as much genetic variation as non metallophyte taxa with similar life history traits was also reported by Mattner *et al.* (2002) on an Australian serpentine endemic, *Hemigenia exilis* ( $H = 0.267$ ). Those results do not support the idea that metal tolerance in plant species should be associated with a low genetic diversity due to strong selection and founder effect at the time of metal tolerance acquisition.

Environmental heterogeneity of metalliferous sites has been reported as one of the factors that might promote genetic diversity in metallicous taxa (Mattner *et al.* 2002) and this may true also for neutral genetic markers because different selective pressures should select for more genotypes than uniform selective pressure. Under this hypothesis, one would expect that, within taxa, populations growing in sites with higher variation of heavy metal concentrations exhibit higher genetic diversity. This was not true for *V. calaminaria* as no correlation was found between genetic diversity and heavy-metal concentrations variation within sites. Even if the number of populations taken into account in these correlations was limited, environmental heterogeneity did not seem to be a major factor promoting genetic diversity in *V. calaminaria* populations.

Gene flow between NT (non-tolerant) and T (tolerant) populations has also been cited as a factor maintaining genetic diversity in metallicous populations (Vekemans and Lefèbvre 1997, Mengoni *et al.* 2000). Recent gene flows from NT populations are not possible for *V. calaminaria* as no counterpart in its area of distribution. However, genes introgression following hybridization with related *Viola* species may be a factor that helps to maintain genetic diversity in *V. calaminaria*. Hybridization among related *Viola* species has been regularly reported (Krahulcova *et al.* 1996, Neuffer *et al.* 1999) and Kakes (1977) found that *Viola guesstphalica* could hybridize with *Viola arvensis* in nature.

The possible autotetraploid origin of *V. calaminaria* may also be a factor maintaining high genetic diversity despite initial founder event and scattered habitat. Tetrasomic inheritance in autotetraploid is expected to reduce the effects of population bottlenecks and genetic drift (Mahy *et al.* 2000, Soltis and Soltis 2000, Lopez-Pujol *et al.* 2004). This hypothesis needs to be tested by studying in more detail the ploidy level of *V. calaminaria* and its relationships with related *Viola* species.

### 4.4.2 Genetic structure

The level of genetic differentiation among populations of the main distribution range was of the same magnitude as that reported by Nymbom and Bartish (2000) for RAPDs studies on endemic species ( $F_{st} = 0.20$ ), mixed / outcrossed species ( $F_{st} = 0.27-0.28$ ) or perennials ( $F_{st} = 0.25$ ). This moderate level of genetic differentiation was observed despite the scattered distribution pattern of the species habitat and may suggest that strict metallophytes did not exhibit higher inter population differentiation than non metallophyte taxa sharing similar life histories. A similar observation was reported by Mattner *et al.* (2002) in the Australian serpentine endemic, *Hemigenia exilis*; while Wolf *et al.* (2000) reported a much

higher level of differentiation in the serpentine endemic *Calystegia collina*. In this last case, however, high differentiation ( $F_{st} = 0.417$ ) was more probably due to the effect of clonality than to the effect of harsh environment (Wolf *et al.* 2000). General conclusions on genetic population differentiation in endemic metallophyte species as compared to non metallophyte should be treated cautiously, however, as  $F_{st}$  values are also dependent on the extent of the area studied (Nybom and Bartish 2000) and metallophyte endemics are generally restricted in their range.

We did not find evidence for a general pattern of isolation by distance at the scale of the main range of *V. calaminaria*. In our case, mining activities resulting in the transport of slags and minerals may have promoted seed dispersal among sites that are far from each other. Those anthropogenic gene flows may have obscured the effect of isolation by distance. Despite a general lack of isolation by distance, our results showed that *V. calaminaria* was genetically differentiated into regional groups of populations, the differences being weak (9%) but significant. Examination of pairwise relationships between populations based on the non rooted dendrogram showed that one group was more homogeneous (mainly recent populations of Liège area). Relations were less evident for other populations but the effect of regional group was still significant when populations from the Liege region were excluded from the analysis (AMOVA:  $F_{ct} = 0.085$ ,  $P = 0.02$ ).

#### 4.4.3 Influence of population size and history

Several studies on RAPD markers have found a significant correlation between population size and genetic diversity (e.g. Fischer and Matthies 1998, Hensen and Oberprieler 2005, Hensen *et al.* 2005) because of small populations are more prone to genetic drift and inbreeding leading to a reduction of heterozygosity (Ellstrand and Elam 1993). In contrast, no significant relationship was found between population size and genetic diversity in *V. calaminaria*. A similar lack of correlation has been reported in other species growing in naturally small and scattered habitat such as natural metallicous sites, naturally salt contaminated sites or alpine habitats (Krüger *et al.* 2002, Mattner *et al.* 2002, Pluess and Stöcklin 2004b). Also, there was no significant difference between the genetic diversity of ancient and recent populations and we found recent populations to exhibit similar genetic differentiation than ancient ones. Similar results were found by Mengoni *et al.* (2000) and Krüger *et al.* (2002), where genetic diversity in recently colonized habitats on copper deposit or salt deposit was found to be higher or similar to that in older populations on naturally contaminated soils. Several models have demonstrated that the genetic consequences of



founder events may be complex and on the dependence of both the number of individuals involved, the number of source populations from which they originated and the number of events of colonization (Slatkin 1977, Wade and McCauley 1988, McCauley *et al.* 1995). The maintenance of genetic diversity may result from successive colonization events. Even in the case of non successive colonization events, the decrease in genetic diversity may be rather low if the growth rate of the newly founded population is very high (Nei *et al.* 1975), a situation that has been documented in some of the recently founded populations of *V. calaminaria* (Bizoux *et al.* 2004). The pattern observed in our study is also more consistent with the ‘migrant pool’ model (Slatkin 1977), in which colonizing individuals are drawn at random from all possible source populations, than with the ‘propagule source’ model (Slatkin 1977) in which the founding group originated from just one of the possible source populations (McCauley *et al.* 1995). Such a situation may have resulted from human mediated transport of seeds from different sites at several different times to the newly colonized sites during mining activities. More genetic studies with different markers (PCR-RFLP on chloroplastic DNA or microsatellites) could help to have a better understanding of new populations creation.

#### 4.4.4 Conservation implications

Ideally, conservation aims to protect as many diverse populations as possible. However, in the case of *Viola calaminaria*, overriding reasons, such as problem for human health and industrial development, may lead to the remediation of some of the metal polluted sites and to the loss of populations. Information about the genetic structure of local populations provides an important tool for the conservation of plant species like *V. calaminaria* and guidelines may be drawn up out from the present study. The significant differentiation among regional groups of populations makes it necessary to develop a hierarchical strategy of conservation with the protection of a set of populations in each region. We have shown that small and recently founded populations are not genetically impoverished and, hence, they can be included in any comprehensive conservation plan. Nevertheless, the level of differentiation among recent population was lower and therefore, extinction of one recent population is less harmful than extinction of an ancient population where individual populations are more differentiated for their genetic pool. Finally, isolated populations because they can represent a unique differentiated gene pool may be of particular interest in conservation. This was clearly the case for the *V. guestphalica* population (VG), which was the most differentiated population. This result confirms the interpretation of Hildebrandt *et al.* (2006) that *V. guestphalica* population represents a

particular genetic pool and thus deserves conservation effort whatever is taxonomic status. In contrast, the low level of genetic differentiation of the isolated population of Auby confirms its identification as *Viola calaminaria* and suggests that it may have been introduced recently from Belgian populations.

## **Chapitre 5 : Within-population genetic structure and clonal diversity of a threatened endemic metallophyte, *Viola calaminaria***

Dans le chapitre précédent, nous avons évalué la variation génétique de *V. calaminaria* sur l'ensemble de son aire de distribution. Nous avons d'une part étudié la connectivité et la structure génétique des populations de l'espèce mais aussi sa diversité génétique. Néanmoins, comme précisé dans le chapitre introductif (Chapitre 1), l'étude de la répartition spatiale de la variation génétique au sein des populations permet également d'améliorer les stratégies de conservation et de gestion. Ce chapitre sera consacré à cette étude dans deux populations aux histoires et conditions pédologiques contrastées. La reproduction végétative de l'espèce sera également estimée. Comme dans le chapitre précédent, la technique RAPD a été utilisée.

## Abstract

We studied the within-population genetic structure and the clonality extent of *Viola calaminaria*, a rare endemic species of calamine soils by means of RAPD markers, in two contrasted populations with different demographic histories (ancient and recent) and potential difference in heavy-metal soil conditions.

At the very local scale (20 cm - 3 m), high levels of clonal diversity were found in both populations. This indicated that clonality is not an important mean of propagation, even in recent population that had undergone rapid demographic extension. Spatial autocorrelations revealed a significant negative value of correlogram slope ( $b$ ) in the two populations. We conclude to a spatial genetic structure at very short distance resulting from a low level of clonality and limited gene flow probably due to restricted seed dispersal.

At a larger scale (2 m - 30 m), spatial autocorrelations revealed positive correlation in the first distance class with subsequent sinusoidal pattern for the two populations. This suggested a patchy distribution of the genetic diversity that might be associated with gene flow between patches probably due to pollen dispersal. No significant difference was found between the two populations, which suggested that different demographic histories and difference in heavy metal soil conditions did not influence the spatial genetic structure. The implications for the conservation of *V. calaminaria* are discussed.

Key words: *Viola calaminaria*, genetic structure, RAPD, spatial autocorrelation, heavy metals.

---

*Bizoux J-P. and Mahy G.*

*Article soumis dans American Journal of Botany.*

## 5.1 Introduction

Spatial genetic structure within plant populations is influenced by various factors such as gene flow (seed or pollen), genetic drift, micro-habitat distribution, population history and micro-environmental selection (Wright 1943, Heywood 1991, Epperson 1993, Kang and Chung 2000, Vekemans and Hardy 2004). Gene flow, mediated by pollen and seed dispersal, is a key factor per se, but also because the degree to which selection and drift affect patterns of genetic variation is known to depend on dispersal ability (Hamrick and Godt 1996). With spatially limited gene flow, populations should be more inbred and more likely to differentiate in response to local selective force or genetic drift (Kang and Chung 2000).

In addition to gene flow, within-population genetic structure may also be influenced by the equilibrium between sexual and vegetative reproduction (clonal growth) (Chung and Chung 1999, Van Rossum *et al.* 2004). Clonal multiplication has been hypothesized to result in a decrease of genetic variation and clonal diversity. However, several reviews have demonstrated that most clonal plants display high genetic diversity, similar to non-clonal plants, and that a low rate of repeated seedling recruitment may be sufficient to maintain genetic diversity (Eriksson 1989, 1993, Watkinson and Powell 1993, Hangelbroek *et al.* 2002). Even in the case of high genetic diversity, clonal growth may influence within-population genetic structure. Vegetative reproduction often leads to clusters of ramets<sup>o</sup> (= potentially independent units of a genet or clone) resulting in high genetic similarity at short distances (Van Rossum *et al.* 2004).

Population history, as well as environmental conditions, may modify the outcome of gene flow and equilibrium between sexual and vegetative reproduction (Leimu and Mutikainen 2005). For example, in recently founded populations that have undergone strong increase in size, a species may exhibit a different reproductive behaviour (increased clonality, more limited gene flow, and spreading front) compared to long established populations, resulting in different within-population genetic structures (Travis *et al.* 2004).

Soils with elevated concentrations of heavy metals (metalliferous soils), because of their phytotoxicity, represent very harsh and restrictive habitats for plants (Antonovics *et al.* 1971, Brown 2001). In such harsh environments, other factors may be important in shaping spatial population genetic structure and modifying the balance between sexual and vegetative reproduction (Van Rossum *et al.* 2004). This kind of environment is generally heterogeneous

---

<sup>o</sup> A ramet is a potentially independent unit of a genet (or clone) and come from vegetative reproduction (Harper 1977). A genet (or clone) represents the genetic individual and is constituted by all tissues coming from one zygote obtained by sexual reproduction. All ramets of one genet are thus genetically identical.

at small spatial scale for several ecological factors. Linhart and Grant (1996) showed evidence from several studies that local adaptation to different environments (e.g. soils parameters) can occur on the scale of a few meters (even centimetres). This may also influence the genetic structure of neutral genetic marker, as environmental heterogeneity should promote the selection of a number of different adapted genotypes. This is supported by several studies on plant populations that have revealed a fine-scale intra-population genetic structure, based on neutral genetic marker, associated with habitat variation (Linhart and Grant 1996, Lönn *et al.* 1996, Li *et al.* 2000, Prentice *et al.* 2000, Van Rossum *et al.* 2004).

In eastern Belgium and western Germany, metalliferous sites consist of calamine soils exhibiting high concentrations of zinc, cadmium and lead (Lambinon and Auquier 1964, Duvigneaud 1982). Metallophyte species historically occurred on natural metalliferous sites and on former mines (ancient populations). However, from the end of 19<sup>th</sup> century to the 1970s, new populations (recent populations) appeared because of increasing habitat availability resulting from industrial pollution. Metallophyte species thus appear as a good model to study variation of within-population structure in populations with different histories in harsh environments. Only few studies have analysed spatial genetic structure within metallicolous populations (Lefèbvre et Vernet 1990, Van Rossum *et al.* 2004). *Viola calaminaria* (Gingins) Lej. is a rare threatened taxon, endemic to calamine soils with its main distribution limited to eastern Belgium and western Germany (Lambinon *et al.* 2004). The species is protected in Belgium and its habitat constitutes a target habitat for the maintenance of biodiversity at the European scale – Annex 1 of the Habitats directive 92/43/EEC of the European Community. In a previous work, we studied the genetic diversity and population genetic structure of the species at the scale of the species distribution range (chapter 3) for conservation purposes. But, in regard to recent or potential future partial destruction of calamine sites, population restoration should be needed (Mattner *et al.* 1999). In this case, sampling methods for seed stocks and decisions about the size area to protect in a population may greatly benefit of spatial genetic information (Chung and Chung 1999, Escudero *et al.* 2003, Torres *et al.* 2003a) in order to maximize genetic diversity.

Our principal aim was to assess the within population genetic structure in two populations of *V. calaminaria* with different demographic histories and potentially different metal stress. We aim to specifically compare i) the extent of clonality and ii) the genetic structuring due to limited gene flow, in these two contrasted situation. Additionally, we consider the implications of within-population structure for conservation strategies.

## 5.2 Material and methods

### 5.2.1 Species

*V. calaminaria* is a perennial clonal pansy that is an ecological endemic from calamine sites (Bizoux *et al.* 2004). Reproduction occurs by seeds with clonal growth achieved by means of rhizomes (Lambinon *et al.* 2004). The spatial extent of genets is unknown. The species is supposed to be mainly allogamous but self-incompatibility was not reported in the genus. Therefore, low autogamy or geinotogamy cannot be excluded. The species flowers from April to November with the flowering peak in June and July. Flowers, generally yellow, are mainly visited by solitary bees, bumblebees and flies (Syrphidae) (personal observation). The species distribution (Fig. 5.1) includes the east of Belgium (north east of the Liège province), the south east of Dutch Limburg and the vicinity of Aachen (west of Germany). *Viola calaminaria* was first described by Lejeune (1811). The taxonomic status of the species is questionable and a recent phylogenetic study (Hildebrandt *et al.* 2006) recommends classifying it as *Viola lutea* subsp. *calaminaria* (Gingins). In Belgium, *V. calaminaria* is considered as a rare calamine-endemic species (Lambinon *et al.* 2004) and undoubtedly, whatever its taxonomic position, *V. calaminaria* is considered as a threatened taxon that is worth of conservation effort because of its ecological particularity.

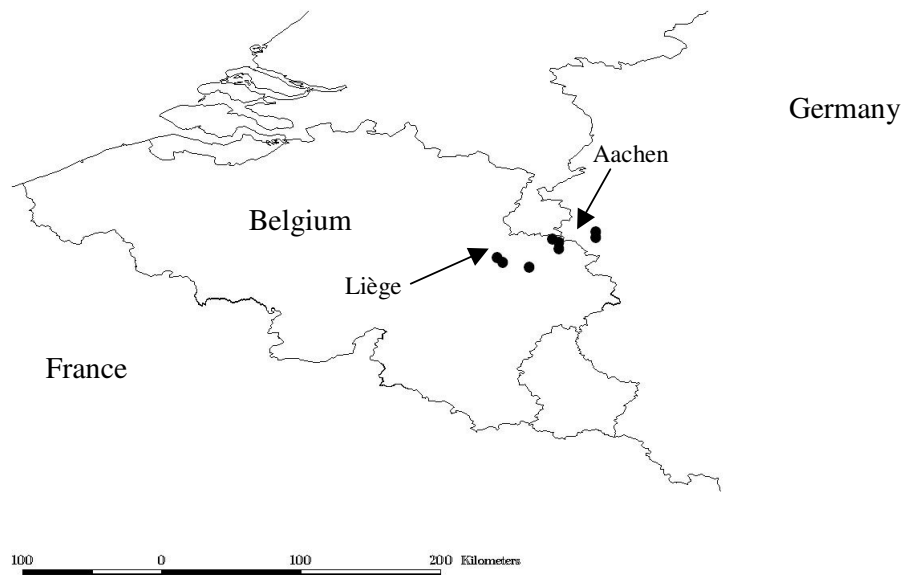


Fig. 5.1: Distribution of *V. calaminaria*. Each point represents area where *V. calaminaria* populations are found.

### 5.2.2 *Plant material and population characterization*

Plant material was collected from Prayon (recent population, Latitude: N 50° 35' 02", Longitude: E 5° 40' 20") and Schmalgraf (ancient population, Latitude: N 50° 41' 47", Longitude: E 5° 59' 36"), two populations with different history. The population of Schmalgraf is established on an ancient mining site (exploited from 1862 to 1932) corresponding to a natural geological orebody. The site corresponds to a primary habitat of the species and the presence of the species may be traced to the most ancient floristic surveys of the region dating from 19<sup>th</sup> (Duvigneaud *et al.* 1979, Graitson 2003). The area of the site is relatively limited and the *V. calaminaria* population is one of the smallest known (150 m<sup>2</sup>) (Bizoux *et al.* 2004). In contrast, heavy metals are found in excess in the site of Prayon as a result of atmospheric pollution approximately from 1829 to 1970 (Duvigneaud and Jortay 1987). *V. calaminaria* has been observed at Prayon for the first time in 1982 (Lefèbvre, pers. comm.). At this time, the species was limited to several scattered square meters. Subsequently, *V. calaminaria* rapidly extended and the population of Prayon is now one of the largest in Belgium (3.22 hectare). We hypothesized that the two populations should exhibit differences in spatial genetic structure as a result of differences in heavy metal stress (natural calamine orebody vs. atmospheric pollution) and/or differences in demographic history (ancient population vs. recent colonization). The recent population was, because of its size, divided into sub-populations i. e. group of of higher density individuals spatially isolated in the population. The sub-population selected for the sampling was the area of the first colonisation of the site.

In each population, ramets were collected along two crossed transects at two sampling scales: a small-scale (< 3 m) and a large-scale (< 30 m). For the small-scale structure, 29 ramets were sampled at 20 cm intervals (Fig. 5.2a) whereas for large-scale within-population structure, 30 ramets were sampled at 2 m intervals (Fig. 5.3a). Small-scale sampling primarily intends to detect clonality extent. Large-scale sampling primarily intends to detect within population structure due to limited gene flow. In the recent and largest population, ten ramets were also sampled in a second sub-population distant from the first one by more than 200 meters.

### 5.2.3 *Soil analysis*

Heavy metals (Zn, Pb, Cd and Cu), Ca and K concentrations were estimated in the study area of each population in order to characterise soil conditions. Soil samples (0-5 cm) were collected at the interval of 2 meters along one transect of 30 meters. Concentrations in available elements were obtained by the acid ammonium acetate-EDTA method of Lakanen



and Erviö (1971). The ratios Zn/Ca and Pb/Ca were also calculated as a measure of soil toxicity (Simon 1978, Brown 2001).

#### 5.2.4 DNA extraction and RAPD amplification

DNA was extracted from leaves using the DNeasy<sup>TM</sup> (Qiagen, Germany) extraction kit. DNA amplification reactions were performed in 25 µl total volume containing: 1X buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP (Fermentas GmbH), 200 µgml<sup>-1</sup> of BSA (Fermentas GmbH), 1 U of Taq DNA polymerase (New England Biolabs Inc.), 10 pmol of primers (Operon Technologies), 20-30 ng of template DNA. Amplifications were performed in a PTC 200 (MJ Research: Biozym) for an initial denaturing step of 2min at 95°C, 44 cycles of 20 sec at 94°C, 60 sec at 36°C, 60 sec at 72°C and a final step of 10 min at 72°C before cooling at 4°C. Controls were included to detect any possible contamination. Amplification products (12 µl) were subjected to electrophoresis in 1.8 % (w/v) agarose gels (containing ethidium bromide) in 1 x TAE buffer and then detected by viewing under UV light, and photographed. Molecular weights were estimated by reference to a 100 base-pair DNA Ladder (GeneRuler, Fermentas GmbH). Seven primers were selected: OPA-2, OPA-10, OPB-12, OPL-1, OPL-2, OPM-15 and OPT-15. Band selection was based on a repeatability test. DNA amplifications for twenty-three individuals were repeated twice and only bands reproducible in both runs were considered for analysis.

#### 5.2.5 Data analysis

Mean soil elements concentrations and the two ratios (Pb/Ca and Zn/Ca) were compared among the two sites with a t-test. When data normality or variance equality could not be reached following data transformation, non-parametric Mann-Whitney tests were used. The level of spatial variation in element concentration was estimated with the coefficient of variation (ratio standard deviation/mean). The pattern of spatial variation was further described by a Mantel correlation test between pairwise euclidean distance of element concentration and geographic distance matrices using Passage version 1.1 (Rossenberg 2001). The amplification products for the different samples were screened for presence/absence (0/1) of the selected bands (57). Bands of identical size amplified with the same primer were considered as homologous.

Clonal diversity was measured at small-scale (< 3 m) in two-way: the proportion of distinguishable genets ( $PD = G/N$ , where  $G$  is the number of genets and  $N$  is the total number of ramets sampled) (Ellstrand and Roose 1987) and the Simpson's index of diversity ( $D = 1 -$

$\sum n_i(n_i-1)/N(N-1)$ , where  $n_i$  is the number of ramets with RAPD phenotype  $i$  and  $N$  is the total number of ramets sampled) in each population.

In order to characterize the spatial genetic structure, Mantel tests were first performed between ramet pairwise euclidean genetic and geographic distance matrices using Passage version 1.1 (Rosserberg 2001). The significance of  $r_M$  was tested by a permutation test (10 000 iterations). Spatial autocorrelation statistics were further applied using Relationship correlogram calculated with SPAGEDI ver 1.2 (Hardy and Vekemans 2002). The relationship coefficient developed by Hardy (2003) is a measure of pairwise genetic similarity between individuals. Distance classes were chosen to obtain at least 30 pairs of ramets in each one and a number of pairs as similar as possible among distance classes. The significance of relationship coefficient in each class and the significance of the slope of the global regression were tested by a permutation test (10 000 iterations). For the small-scale structure, eight distance classes were defined: 0-0.3 m, 0.3-0.5 m, 0.5-0.7 m, 0.7-0.9 m, 0.9-1.1 m, 1.1-1.5 m, 1.5-1.9 m and 1.9-3.0 m. Spatial autocorrelations were also performed at the genet level. When several ramets exhibited the same genotype, only one (putative) genet was taken into account for the analysis considering the mean geographic position of the identical ramets. For the large-scale within-population structure, distance classes were: 0-3 m, 3-5 m, 5-7 m, 7-9 m, 9-12 m, 15-20 m and 20-30 m.

The level of differentiation between the two sub-populations of the recent population was evaluated throughout  $F_{st}$  estimated by Arlequin ver 2.000 (Schneider *et al.* 2000).

## 5.3 Results

### 5.3.1 Comparisons of soil conditions

Significant mean differences were found for soil concentrations of all heavy metal (Zn, Pb, Cd and Cu) between the two populations. The recent population always exhibited higher concentration of heavy metal in soils except for Pb (Table 5.1). Ca and K concentrations in the soil of the recent population were significantly higher than in the ancient one. The ratio Pb/Ca was significantly higher in the ancient population than in the recent one and no significant difference was found for the Zn/Ca ratio.

The coefficients of variation (CV) for heavy metal concentrations varied from 39.5% to 89.7% (Table 5.1). They were quite similar between the two sites except for Cu (twice higher in the recent population). Pb exhibited the highest concentration variation in the two populations as well as Cu in the recent population (CV > 70%). Other heavy metals displayed CV about

50 %. The examination of the spatial variation with a Mantel test showed that only three correlations between pairwise heavy metal concentrations differences and pairwise spatial distances were significant: Zn ( $r = 0.240$ ,  $P = 0.031$ ) and Cd ( $r = 0.618$ ,  $P < 0.001$ ) in the ancient population; Cd ( $r = 0.220$ ,  $P = 0.038$ ) in the recent population. All other correlations were not significant indicating that pairwise heavy metal differences at short distance could be as high as at long distance. The two ratios (Zn/Ca and Pb/Ca) also appeared to be very variable in the two populations particularly for Pb/Ca.

Table 5.1: Soil conditions characterization in the recent and ancient population of *V. calaminaria*.

	Population	Means of soil conditions	Test Mann–Whitney (means difference between populations)	CV (%)	Mantel test correlation between matrices of euclidean soil element and geographic distance
Ca	recent	301 ppm	$P < 0.001$	91	$r = 0.05$ <sup>NS</sup>
	ancient	93 ppm		59	$r = -0.25$ *
K	recent	17 ppm	$P = 0.011$ (Test <i>t</i> )	35	$r = -0.17$ <sup>NS</sup>
	ancient	10 ppm		75	$r = 0.08$ <sup>NS</sup>
Zn	recent	7693 ppm	$P = 0.003$	51	$r = 0.02$ <sup>NS</sup>
	ancient	3403 ppm		40	$r = 0.24$ *
Pb	recent	1020 ppm	$P < 0.001$	72	$r = -0.04$ <sup>NS</sup>
	ancient	3996 ppm		88	$r = -0.01$ <sup>NS</sup>
Cd	recent	179 ppm	$P < 0.001$	43	$r = 0.22$ *
	ancient	8 ppm		53	$r = 0.62$ ***
Cu	recent	542 ppm	$P < 0.001$	90	$r = -0.02$ <sup>NS</sup>
	ancient	11 ppm		40	$r = -0.16$ <sup>NS</sup>
Zn/Ca	recent	38	$P = 0.602$ (Test <i>t</i> )	84	$r = -0.01$ <sup>NS</sup>
	ancient	42		35	$r = 0.03$ <sup>NS</sup>
Pb/Ca	recent	5	$P < 0.001$	112	$r = -0.08$ <sup>NS</sup>
	ancient	67		123	$r = 0.07$ <sup>NS</sup>

### 5.3.2 Clonality and genetic structure at small scale

From the 58 ramets sampled, 47 different putative genets were found. The proportion of distinguishable genets (*PD*) within population was 0.9 and 0.76 for the recent and ancient populations, respectively. The Simpson index of diversity (*D*) was 0.99 and 0.98 for the recent and ancient populations, respectively. Most of the shared RAPD profiles were in two copies. Only one RAPD profile was shared by three ramets (Fig. 5.2a). All ramets belonging to the same genet were located in each other's direct vicinity (20 cm) except one at 40 cm. In the recent population, the matrix of genetic distances among ramets was not significantly correlated with the corresponding matrix of geographical distances (Mantel test;  $r = -0.100$ ,  $P = 0.060$ ) contrary to the ancient population (Mantel test;  $r = -0.435$ ,  $P < 0.001$ ). Relationship correlograms (Table 5.2) were globally significant (Fig. 5.2b) for the two populations. The mean slope (*b*) of the regression between pairwise relationship coefficient

and logarithmic spatial distance was  $-0.244$  ( $P < 0.001$ ) for the ancient population and  $-0.138$  ( $P < 0.001$ ) for the recent one. Those slopes were not significantly different between the two populations ( $P = 0.095$ ; Student t-test with polymorphic loci as replicates).

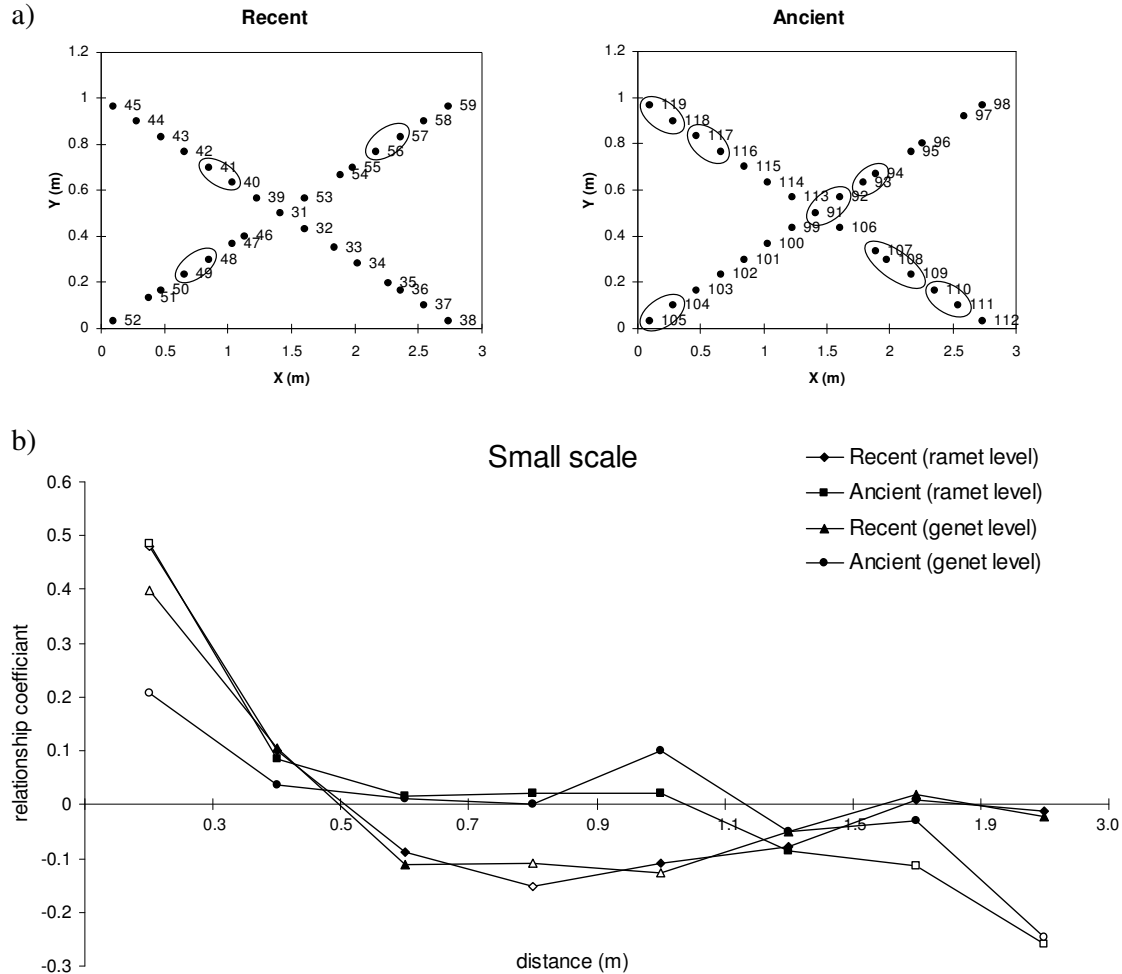


Fig. 5.2: Spatial genetic structure of *Viola calaminaria* at small scale (20 cm). a) Sampled individuals localisation. Ramets of the same genet (RAPD phenotypes) are circled. b) Relationship coefficient correlogram. Unfilled symbols represent significant ( $P < 0.05$ ) relationship coefficient values.

Spatial autocorrelation at very short distances revealed positive correlation extending to 0.4 m in the recent population and 1 m in the ancient one. Only the first distance class values were significantly positive ( $P < 0.001$ ) for the two populations. Negative significant autocorrelation was found between 0.7 and 0.9 m in the recent population while it appeared only after 1.5 m in the ancient population.

Spatial autocorrelation (Fig. 5.2b, Table 5.2) also showed that differences appeared, in the first distance class, between ramet and genet correlograms for the ancient population and not

for the recent one. In the ancient population, relationship coefficient value decreased from 0.486 (ramet level,  $P < 0.001$ ) to 0.206 (genet level,  $P = 0.016$ ) but the difference did not prove to be significant ( $t = 1.71$ ,  $P = 0.097$ ). The mean slope ( $b$ ) of the regression (genet level) between pairwise relationship coefficient and spatial distance was -0.140 ( $P < 0.001$ ) for the ancient population indicating that this correlogram was also globally significant. This slope did not significantly differ from the slope at the ramet level ( $P = 0.250$ ; Student t-test with polymorphic loci as replicates).

Table 5.2: Synthesis of the different results obtained in the spatial genetic structure analysis.  $r$  represent the Mantel test correlation coefficient between matrices of euclidean genetic and geographic distance;  $b$  represent the mean slope value of the correlogram; Patch size was estimated according to Sokal (1979).

	Small-scale structure (20 cm - 3 m)		Large-scale structure (2 m - 30 m)	
	Ancient population	Recent population	Ancient population	Recent population
Mantel test	$r = -0.435$ $P < 0.001$	$r = -0.100$ $P = 0.060$	$r = 0.060$ $P = 0.170$	$r = -0.008$ $P = 0.510$
Correlogram	$b = -0.244$ $P < 0.001$	$b = -0.138$ $P < 0.001$	$b = -0.027$ $P = 0.039$	$b = -0.050$ $P = 0.002$
Patch size	1 m	0.5 m	4 m	4 m
Ramet/Genet difference	Diminution of the relationship coefficient in the first class distance but not significant	No		

### 5.3.3 Large scale within-population structure

At large-scale, all the ramets sampled exhibited different RAPD genotypes (Fig. 5.3a). In both recent and ancient population, the matrices of Euclidian genetic distances among individuals (genets) were not significantly correlated with the corresponding matrices of geographical distances (Table 5.2, Mantel test;  $r = -0.008$ ,  $P = 0.510$  and  $r = 0.060$ ,  $P = 0.170$ , for the ancient and the recent populations, respectively).

Relationship correlograms (Table 5.2) were globally significant (Fig. 5.3b) for the recent population (mean  $b = -0.050$ ,  $P = 0.002$ ) and for the ancient population (mean  $b = -0.039$ ,  $P = 0.027$ ) with no significant difference between the two population means  $b$  ( $P = 0.893$ , Student t-test with polymorphic loci as replicates).

Spatial autocorrelation revealed a positive and significant ( $P < 0.010$ ) correlation in the first distance class (0-3 m) for both populations (Fig. 5.3b) and a negative correlation in the second distance class. Subsequent correlogram patterns were sinusoidal for the two populations with only one negative significant value for the recent population between 7 and 9 m. Positive

correlations were found at 5-7 m for recent population and at 15-20 m for the ancient population.

The  $F_{st}$  value between the two sub-populations of the recent population was equal to 0.15 and was highly significant ( $P < 0.001$ ).

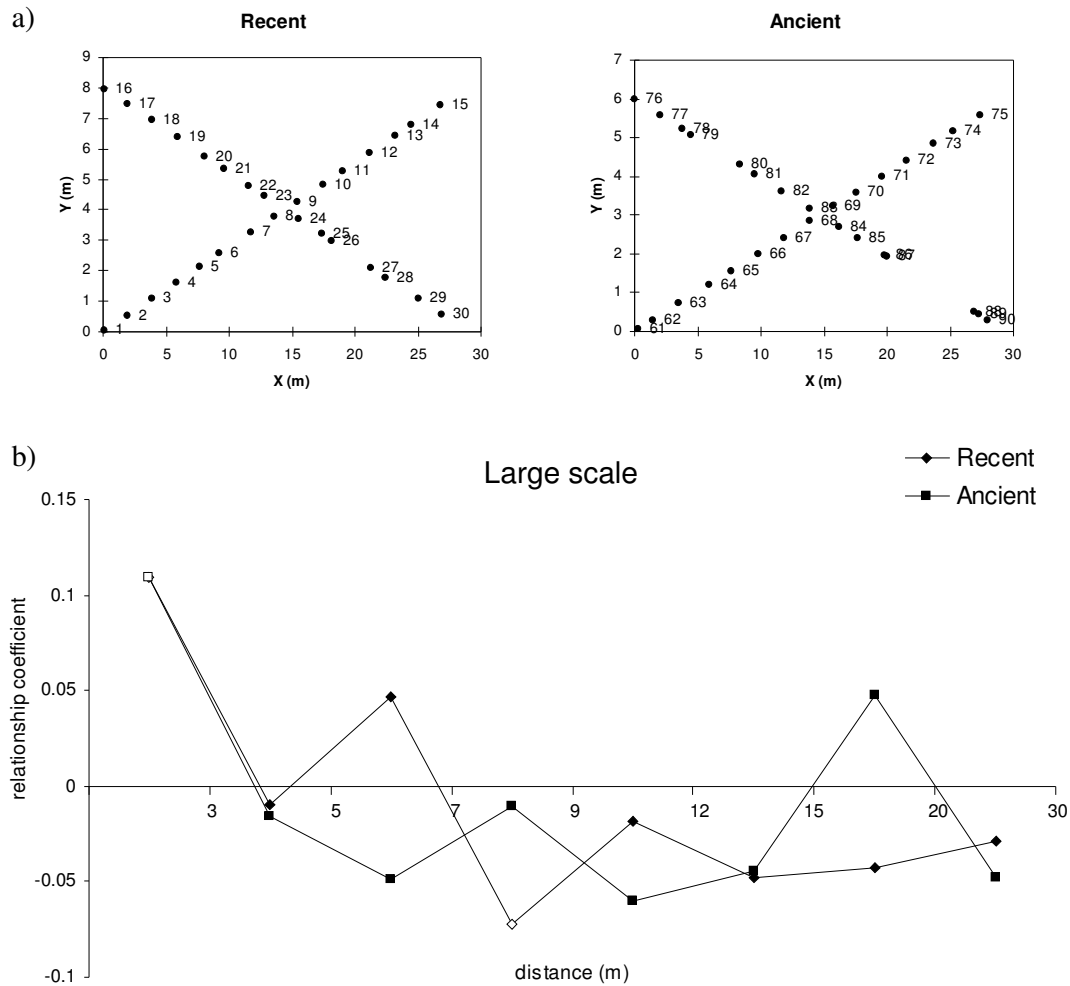


Fig. 5.3: Within population spatial genetic structure of *Viola calaminaria* at large scale (2 m). a) Sampled individuals localisation. b) Relationship coefficient correlogram. Unfilled symbols represent significant ( $P < 0.05$ ) relationship coefficient values.

## 5.4 Discussion

Our results on soil conditions showed that the two populations were quite different. Ratios of exchangeable heavy metal to calcium are considered to be a better measure of soil toxicity on vegetation in calamine site than heavy metal concentrations per se (Simon 1978, Brown 2001). The ancient population presented a higher Pb/Ca ratio than the recent one and may thus be a more toxic environment. However, this must be tempered with the fact that, in

addition to Zn and Pb, two other heavy metals (Cd and Cu) were in excess in regard to phytotoxicity thresholds (de Temmerman *et al.* 1984) in the recent population and not in the ancient one. The presence of these heavy metal in excess (Cd and Cu) could lead to harsher environment for *V. calaminaria* growth. Thus, the two populations appeared to display contrasted soil conditions. For the spatial variation of heavy metal concentrations and of the two ratios, we conclude to a medium or high variability as suggested by Paz-Gonzalez *et al.* (2001) without any important difference between the two populations.

#### 5.4.1 Clonality and genetic structure at small scale

In comparison with other clonal plants, *Viola calaminaria* displayed a high clonal diversity. Our mean values of *PD* (0.83) and *D* (0.985) are superior to means reported by Hangelbroek *et al.* (2002) and based on nine studies (*D* = 0.74 and *PD* = 0.44) and were similar to *Viola riviana* (*D* = 0.99 and *PD* = 0.93; Auge *et al.* 2001). In general, ramets sharing the same genotype were spatially aggregated (0.20 m) with only one genet spreading over larger distances (0.4 m). We did not detect spatial mixing of ramets. The results indicate that clonality is not an important mean of propagation, even in populations having undergone a recent rapid demographic extension such as in the recent one. Our results suggest that after colonization *V. calaminaria* follows the RSR (repeated seedling recruitment) model (Eriksson and Fröberg 1996).

Balance between sexual and vegetative reproduction could also be modified by heavy metal impact. For instance, for different species, clonal growth was reported to be higher under harsh ecological conditions, e.g. at range margins (Eckert *et al.* 1996), increasing latitude (Stenström *et al.* 2001) and altitude (Young *et al.* 2002) or on a copper–nickel polluted soil (Salemaa *et al.* 1999, Salemaa and Sievanen 2002). Clonal growth can in fact contribute to propagate or perpetuate well-adapted genotypes (Salemaa and Sievanen 2002, Van Rossum *et al.* 2004) in harsh environments. In our study, the ancient population was a bit more prone to clonality but no important clonal growth patterns were observed in the two populations. In *V. calaminaria*, clonal growth cannot be interpreted as a strategy for propagating or perpetuating adapted genotypes under the harshest ecological constraints (soil conditions). The little difference observed could simply be the result of a better reproduction success in the recent population (fructification percentage: 68 % - 28 % and seed production: 20.6 – 13.9 seeds per fruit, respectively for recent and ancient population) (chapter 3) that may promote a higher sexual recruitment (Van Rossum *et al.* 2004).

For spatial structure at small-scale, the significant negative value of  $b$  indicated that, on average, ramets that were spatially close were more likely to be genetically related than ramets that were separated by a larger distance. These results pointed out a spatial genetic structure at very short distance resulting from a combination of limited gene flow and low level of clonality. In fact, correlograms obtained at the genet level were also significant and no significant difference appeared with the ramet level, indicating that clonality did not have a major impact on the spatial genetic structure at small-scale. Non-random gene dispersal is thus the key factor in establishing the internal spatial genetic structure observed. Although gene movement in seed plants involves both pollen and seed, a variety of theoretical arguments (Hamrick and Nason 1996, Heuertz *et al.* 2003) and empirical data indicate that the development of spatial genetic structure within populations is more strongly influenced by seed than pollen dispersal (Kalisz *et al.* 2001, Heuertz *et al.* 2003, Chung *et al.* 2004). The shape of the regression between the relationship coefficient and the logarithm of the distance obtained for the spatial autocorrelation (genet level, small-scale) was found to be concave ( $k > 0$  for cubic regression), suggesting that seed dispersal was more restricted than pollen dispersal (Heuertz *et al.* 2003, Vekemans and Hardy 2004). Beattie and Lyons (1975) found that the mean distance of dispersal obtained by capsule explosion of diverse *Viola* species ranged from 0.8 to 2.1 meters. In addition, *Viola* seeds are known to be dispersed by ants. Studies on seed dispersal by ants show that the distance of transport is very limited. For example, in a review, Gomez and Espadaler (1998) found a mean distance of 0.87 m on Northern hemispheric myrmecochorous species and on *Viola* species, some authors reported that the dispersal distance does probably not exceed 2-3 m (Beattie and Lyons 1975, Oostermeijer 1989, Ohkawara and Higashu 1994). Thus, the spatial structure observed at small-scale was probably due to limited seed dispersal by means of capsule explosion and possible ant transport. According to Sokal (1979), patch size of genetically linked individuals (genets) could be estimated by the intersection of the correlogram with the x-axis. Thus, the patch size, observed at small spatial scale, can be estimated to about 1 m. This distance corresponds well to the two distances of seeds dispersion (capsule explosion and ant transport).

Overall, the available evidence indicates that *Viola calaminaria* combines sexual recruitment and weak clonal propagation as mechanisms of regeneration independently of population history and soil conditions.



#### 5.4.2 Large scale within-population structure

At large-scale, correlograms were globally significant for the two populations and no difference was found between the two population correlograms (mean  $b$ ). This suggests that population history and environmental conditions did not influence within-population structure of *Viola calaminaria*. The effect of population history on the within-population genetic structure could be temper because only fifty years separated the end of perturbation in the ancient population and the creation of the recent population. This may be insufficient to produce a strong difference.

Spatial autocorrelation revealed a positive and significant correlation in the first distance class (2 m) for both populations. This probably reflects the occurrence of patches of genetically more similar individuals resulting from limited seed dispersal (see small-scale structure). Subsequent correlogram patterns were sinusoidal for the two populations with only one significant value for the recent population. Positive correlation was found at 6 m for recent population and at 17 m for the ancient population. These results suggested a patchy distribution of the genetic diversity with genetically similar individuals at longer distances than 4 m. This pattern may be due to privileged pollen exchange between some patches, patchy distribution of seeds, and/or possible recruitment from seed banks (Tague and Fore 2005). The explanation for this result could be the fact that gene flow occurs at two different spatial scales, with localized seed dispersal (see small-scale structure) resulting in family grouping and more long distance pollen dispersal occurring between some patches. Even if pollinators of *V. calaminaria* are not well known (bumblebees, solitary bee, syrphidae) they could transport pollen at distance longer than few meters.

Seed bank can also influence the pattern of spatial genetic structure because seed bank could have a different spatial genetic structure or a different genetic composition than the adult stage (e.g. Cabin 1996, England *et al.* 2003, Shimono *et al.* 2006). *V. calaminaria* develop a short term persistent seed bank containing about 900 seeds m<sup>2</sup> (Bizoux unpublished). As suggested by Mahy *et al.* (1999), genetic consequences of a seed bank may vary among species and/or populations. In our case, as found by England *et al.* (2003), seed bank germination could contribute to perturb the equilibrium expected resulting from gene flow and genetic drift (pattern of isolation by distance). By reintroduction of genotypes, it could be except that, just by chance, some patches are more similar to one another independently of distance and thus favour sinusoidal pattern.

### 5.4.3 Conservation implication

Study of the spatial genetic structure provides guidelines for selection of individuals for transplantation purposes for restoration after population destruction and defines the meaningful within-population conservation unit. Estimation of *V. calaminaria* patch size resulting from local genetic structure suggests that is not worth collecting individuals at less than one meter from each other. Individuals within this distance class are more related than the average of the population and collecting individuals within this area may result in a lower level of genetic diversity among the sampled individuals (Tero *et al.* 2005).

Our results also showed than at distances longer than 200 m, subpopulations exhibited significant genetic differentiation. This implies that seed must also be collected in different subpopulations. Partial destruction of a site can lead to the loss of genetic variation and implies conservation of the different subpopulations in order to maintain differentiated *Viola calaminaria* genetic pools.

## **Chapitre 6 : Discussion sur les perspectives de conservation de *Viola calaminaria***

Le présent travail a permis d'acquérir des connaissances sur divers aspects de l'écologie, la biologie, la génétique de *Viola calaminaria* en vue de promouvoir le développement de stratégies de conservation. Les différents chapitres ont présenté de manière indépendante des éléments clés d'études de la biologie de la conservation: l'écogéographie de l'espèce (Chapitre 2), le succès reproducteur (Chapitre 3) et la variation génétique (Chapitres 4 et 5). Dans ce chapitre de conclusion, ces différents éléments d'études seront intégrés et discutés selon trois grandes particularités de l'espèce pouvant influencer sa conservation: l'impact des métaux lourds, l'effet de la taille des populations et de leur isolement, l'histoire des populations. Pour terminer, à travers les particularités de l'espèce et les menaces pesant sur les sites calaminaires et sur *V. calaminaria*, nous allons essayer de présenter des pistes pour la conservation de *V. calaminaria* en Région Wallonne.

### **6.1 Impact des métaux lourds**

#### *6.1.1 Intérêt conservatoire de V. calaminaria et rang taxonomique*

Les espèces endémiques dont l'aire de distribution est restreinte posent des questions fondamentales concernant les facteurs qui limitent la distribution géographique de ces taxons, facilitent leur persistance ou favorisent leur différenciation (Gaston 1998). Dans certains cas, les endémiques strictes occupent des habitats discontinus dans des conditions climatiques ou édaphiques particulières, différentes des conditions des habitats environnants (Kruckeberg et Rabinowitz 1985). Dans le cas des espèces calaminaires, leur endémisme écologique intervient également de manière prépondérante dans la nécessité de les conserver. En effet, comme nous l'avons précisé dans le chapitre 1, l'intérêt conservatoire des métallophytes est lié à la particularité de leur habitat (concentrations élevées en métaux lourds) qui provoque leur différenciation et l'apparition de pool génétique particulier adapté à ce milieu. L'intérêt de *V. calaminaria* n'est donc pas le même si elle arrive à croître sur des sites non "pollués". Cette question se pose essentiellement suite à l'apparition récente de l'espèce sur des sites peu connus et qui ressemblent à des friches industrielles assez banales comme à Angleur. Nos résultats montrent cependant clairement que l'espèce est uniquement inféodée aux milieux enrichis en métaux lourds, même dans les sites récents (Chapitre 2). La gamme de concentrations en Zinc et Plomb dans les sols des sites où *V. calaminaria* est présente est très

large mais toujours supérieure aux seuils de phytotoxicité (Chapitre 2). Les rapports des concentrations de ces deux métaux avec le Calcium le confirment d'ailleurs. Il apparaît également que la présence de l'espèce ne semble pas limitée par des teneurs très élevées en Zinc ou en Plomb. La raison pour laquelle l'espèce est uniquement présente dans de telles conditions édaphiques n'est pas évidente. Il est possible que l'espèce possède un "besoin" minimum en métaux pour se développer ou qu'elle soit simplement exclue des habitats moins marginaux lorsque la compétition avec les autres espèces devient trop importante. Seules des études complémentaires, notamment de compétition ou d'écophysiologie, apporteront sans doute des éléments de réponse. Une étude plus fine de la relation entre la densité de *V. calaminaria* et les concentrations en métaux lourds (Zn, Pb, Cd, Cu) dans les sols au sein de certaines populations pourrait probablement mettre en évidence des concentrations excessives en métaux qui limiteraient la présence de l'espèce.

Par contre, la diversité des groupes phytosociologiques obtenus confirme l'amplitude relativement large de l'espèce pour d'autres conditions pédologiques ou environnementales. Seule l'intensité lumineuse a une influence notable sur sa présence au sein des populations. L'absence d'espèces arborescentes dans les relevés montre que l'espèce est une héliophile stricte. Elle ne semble supporter que le faible ombrage de quelques bouleaux épars comme à Prayon (Obs. Perso.) et disparaît complètement sous le couvert de la forêt comme au Schmalgraf ou sous le couvert de chênes rabougris comme à Prayon, Bois-les-Dames ou Streupas, alors que d'autres métallophytes, comme le *Thlaspi calaminaire*, s'y maintiennent.

Outre les particularités écologiques, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le rang taxonomique spécifique de *Viola calaminaria* est remis en cause et il apparaît que le rang de sous-espèce (*Viola lutea* subsp. *calaminaria*) serait plus adéquat. Or, la définition de priorités de conservation est souvent basée sur le concept d'espèce (Primack 1998, Heywood et Iriondo 2003). La législation et les financements octroyés par les institutions se font sur base du concept d'espèce (Isaac *et al.* 2004) bien que celui-ci soit multiple et peut s'appréhender selon différentes définitions<sup>P</sup>. Les ressources allouées pour la conservation d'un taxon sont souvent basées prioritairement sur son statut taxonomique (Haig 1998). Néanmoins, quel que soit le

---

<sup>P</sup> Définitions d'une espèce (Ridley 2004)

1. Espèce biologique : groupe d'organismes interféconds, isolé des autres par la barrière de la reproduction. Elle pose de nombreux problèmes chez les plantes à cause de phénomènes comme l'hybridation, l'autogamie, la reproduction végétative, ...
2. Espèce écologique : groupe d'organismes adaptés à un ensemble de ressources, appelé niche. Les populations forment alors des ensembles phénétiques distincts, reconnus comme espèce, parce que les processus écologiques et évolutifs contrôlant la répartition des ressources tendent à produire ces ensembles.
3. Espèce phénétique : groupe d'organismes de formes phénotypiques ressemblantes. C'est la manière classique utilisée pour définir les espèces.
4. Espèce phylogénétique : l'espèce est considérée comme une unité monophylétique, à laquelle appartiennent les ancêtres et les descendants d'une lignée évolutive.

niveau taxonomique de *V. calaminaria* et eu égard à son endémisme écologique très particulier, la conservation de ce taxon apparaît primordiale sur le point de vue évolutif. En effet, dans une perspective de conservation, il est également impératif de tenir compte de l'histoire évolutive des taxons (Haig 1998). Ennos *et al.* (2005) préconisent, pour des groupes taxonomiques complexes, la conservation des processus évolutifs qui génèrent la biodiversité plutôt que la préservation d'un nombre limité de taxons, souvent mal définis. Ce principe s'applique très bien au cas des métallophytes qui présentent souvent des adaptations étonnantes résultant de processus évolutifs particuliers. *V. calaminaria* ne semble d'ailleurs pas répondre comme *V. lutea* ou *V. tricolor* par rapport aux métaux lourds (Jedrzejczyk *et al.* 2002). Les plans de gestion de ces espèces devraient donc intégrer les processus évolutifs et écologiques qui sont la base des réponses adaptatives aux changements environnementaux (Robertson *et al.* 2004, Ennos *et al.* 2005, Mc Kay *et al.* 2005). Dans le cas de *V. calaminaria*, les processus évolutifs sont évidemment inhérents aux métaux lourds dans le sol et la conservation des sites calaminaires permet donc de conserver les processus évolutifs.

### 6.1.2 *Effet des métaux lourds sur la variation génétique et le succès reproducteur de V. calaminaria*

Les milieux calaminaires sont particulièrement hostiles au développement des végétaux. La pression de sélection sévère des métaux lourds et l'isolement géographique important des populations peuvent être des facteurs importants de différenciation pouvant mener à des phénomènes de micro-évolution (Lefèbvre et Vernet 1990, Mengoni *et al.* 2000, Macnair 2002). Néanmoins, ces deux facteurs pourraient également influencer la viabilité des populations des taxons colonisant les sites métallifères. La pression de sélection sévère des métaux peut entraîner une diminution de la diversité génétique. Notamment, l'apparition d'effet de fondation majeur due à la sélection d'un nombre limité de génotypes sous une pression sélective sévère lors de l'acquisition de la tolérance aux métaux lourds et l'évolution des taxons pourrait réduire la diversité génétique des métallophytes (Vekemans et Lefèbvre 1997). D'un autre côté, les milieux calaminaires (et les milieux métallifères en général) sont considérés comme hétérogènes à petite échelle au sein des populations (Linhart et Grant, 1996) pour plusieurs facteurs écologiques (concentrations en métaux lourds, xéricité, ...). Suite à cette hétérogénéité du milieu, la diversité génétique pourrait être plus importante que ce qui est attendu sous l'hypothèse des effets de fondation (Krüger *et al.* 2002, Mattner *et al.* 2002, Pluess et Stöcklin 2004b). L'isolement géographique des populations peut aussi entraîner une différenciation génétique accrue suite à de faibles flux de gènes. Ces flux de

gènes peuvent être insuffisants pour contrecarrer les effets de la dérive génétique qui, à terme, entraîneraient une diminution de la diversité génétique. Enfin, la pression des métaux pourrait avoir un impact sur le succès reproducteur, soit de manière directe dû à leur toxicité, soit de manière indirecte sous l'effet de la dépression de consanguinité liée à la dérive génétique.

Les résultats obtenus dans l'étude ne correspondent généralement pas à l'hypothèse de réduction de la diversité génétique. Nous avons montré qu'il n'y avait pas de diminution de la diversité génétique chez *V. calaminaria* comparée à d'autres espèces rares ayant des traits d'histoire de vie identiques (Chapitre 4). Cette diversité génétique n'est corrélée ni avec les concentrations en métaux lourds ni avec la variation de ces concentrations. L'hétérogénéité du milieu ne semble donc pas expliquer dans notre cas le maintien d'une diversité génétique importante. Dans le chapitre 4, nous avons mentionné que l'autotétraploïdie probable de l'espèce pourrait aider à maintenir une haute diversité génétique. Au vu des études récentes sur les relations phylogénétiques de l'espèce (Hildebrandt *et al.* 2006), l'origine par autotétraploïdie apparaît moins probable. Nous avons également mentionné que l'hybridation de l'espèce avec une autre espèce de pensée pourrait augmenter la diversité génétique. Ce phénomène d'hybridation est possible mais plutôt récemment, notamment avec des pensées de jardins pour les populations proches des habitations. A Auby, des pensées morphologiquement très proches de pensées de jardins ont d'ailleurs pu être observées (Obs. Perso.). De tels individus ont également pu être observés à Prayon (Lefèbvre, Comm. Perso.). Une hybridation lors de la différenciation du taxon est peu probable (Hildebrandt *et al.* 2006, chapitre 1 point 3.3). L'hybridation naturelle avec des taxons sauvages, après la différenciation de *V. calaminaria*, apparaît également peu probable. En effet, deux autres pensées sont présentes en Wallonie: *Viola tricolor* et *Viola arvensis*. Premièrement, *V. tricolor* est quasi absente de l'aire de distribution de *V. calaminaria* et les possibilités d'hybridation sont donc limitées. *V. arvensis* est bien présente et pourrait donc s'hybrider avec *V. calaminaria* comme elle le fait avec *V. guesphalica* (Kakes 1977). Néanmoins, la morphologie et la couleur de la fleur de *V. arvensis* sont tout à fait différentes de *V. calaminaria*. Des hybrides, même peu fréquents, entre les deux taxons devraient facilement être remarqués. Notamment, les hybrides entre *V. arvensis* et *V. tricolor* sont facilement observables (Obs. Perso.). Or aucune étude n'a rapporté ce fait alors que les milieux calaminaires sont parcourus depuis de nombreuses années par les naturalistes. Le parcours de l'entière des populations de *V. calaminaria* en Région Wallonne dans le cadre de notre étude, dont certaines pendant trois années, n'a pas permis l'observation d'individus qui pouvaient ressembler à des hybrides *V. calaminaria* x *V. arvensis* (Obs. Perso.).

Dès lors, quels autres facteurs pourraient être à l'origine du maintien de la diversité génétique chez *V. calaminaria* ? Le succès reproducteur élevé de l'espèce (Chapitre 3), une croissance démographique rapide dans certaines populations (Nei *et al.* 1975), une densité élevée de la banque de graines ( $\pm 900$  graines/m<sup>2</sup> au printemps dans les 10 premiers centimètres du sol, banque de graine permanente à court terme; Obs. Perso.) et une reproduction majoritairement sexuée sont des caractères susceptibles de participer au maintien de la diversité génétique au sein du taxon.

Contrairement aux attentes basées sur l'isolement spatial des taches d'habitat, la différenciation génétique entre les populations de *V. calaminaria* n'est pas supérieure à d'autres espèces non métallophytes ayant des traits d'histoire de vie similaires et aucun isolement génétique par la distance entre les populations n'a été observé. Les flux de gènes entre les populations sont ou ont dû être plus élevés que ne le laisse supposer la distribution très fragmentée de l'espèce. Ces flux de gènes, qu'ils soient anciens ou plus récents, sont plus que vraisemblablement d'origine anthropique (déplacement des mineurs, transports des minéraux ou de déblais miniers, promeneurs, déplacement des naturalistes). Ceci est confirmé par la faible corrélation entre la distance géographique et le *F<sub>st</sub>* (test Mantel) qui indique un manque d'isolement par la distance résultant de flux de gènes entre sites plus éloignés (Chapitre 4).

Finalement, même si la toxicité des métaux ne semble pas avoir d'impact sur la diversité génétique de l'espèce et donc sur son potentiel adaptatif, il semble qu'elle ait un impact plus important et ce de manière directe, sur le succès reproducteur surtout sur la production de graines (Chapitre 3). En effet, une corrélation négative a été obtenue entre le ratio Zn/Ca (souvent utilisé comme mesure de la toxicité des sols calaminaires) et la production de graines. Un autre ratio (Ca/Mg) est également corrélé positivement avec ces deux paramètres du succès reproducteur. En fait, le comportement du Magnésium dans le sol est tout à fait différent de celui du Calcium. Le Magnésium est un élément beaucoup plus mobile que le Calcium et présente à cet égard un comportement plutôt similaire à un monovalent comme le Sodium. Il n'interagit donc pas de la même manière avec les métaux que le Calcium et des sols "enrichis" en Magnésium (en proportion par rapport au Ca) fixeront donc moins les métaux. Or, certains sites calaminaires sont présents sur des dolomies, qui sont des roches plus riches en Magnésium. Le ratio Ca/Mg apparaît donc comme un bon indicateur pour ce type de milieu (Bock<sup>4</sup>, Comm. Perso.), notamment pour leur phytotoxicité. Le ratio

---

<sup>4</sup> Professeur Laurent Bock, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Unité SOLECOTER, Laboratoire de Géopédologie.

Ca/Mg agit évidemment en parallèle avec le ratio Zn/Ca. On voit clairement l'influence du Calcium, via ses interactions avec d'autres éléments du sol, sur le succès reproducteur de *V. calaminaria*. Des études physiologiques sur l'espèce permettraient sans doute d'éclairer le rôle joué par le Calcium.

## 6.2 Effet de la taille des populations et de leur isolement

Dans l'introduction du présent travail (Chapitre 1), nous avons mentionné que la destruction et la fragmentation des habitats, liées aux activités humaines, sont les deux menaces les plus importantes qui pèsent sur les espèces. Ces changements entraînent une diminution de la taille des populations et l'augmentation de l'isolement entre celles-ci pouvant entraîner l'espèce dans une spirale vers l'extinction. Deux synthèses récentes (Reed et Frankham 2003, Reed 2005) indiquent qu'il existe, en général, une corrélation positive et significative entre la taille, la diversité génétique et la "fitness" des populations. Cependant, une distribution fragmentée en petites populations peut être une caractéristique propre de l'espèce et ne pas refléter des changements récents (Wolf et Harrison 2001, Leimu et Mutikainen 2005) comme dans le cas de *V. calaminaria*. Ces espèces sont la plupart du temps parfaitement adaptées à leur milieu (Begon *et al.* 1996, Wolf et Harrison 2001). Les conséquences des activités anthropiques sur ces espèces peuvent donc être différentes mais peu d'études sont disponibles pour tester cette hypothèse (Wolf et Harrison 2001). Examiner comment réagissent ces espèces est donc primordial.

La taille estimée des populations de *V. calaminaria* est très variable, allant de très petites populations (< 1 m<sup>2</sup>) jusqu'à une population de 3.2 hectares (Chapitre 2). Quatre populations présentent des tailles inférieures à 1 m<sup>2</sup>. Les deux plus petites (0.002 m<sup>2</sup>) étaient constituées de quelques individus (2 individus par exemple sur la pelouse du Huset). Ces deux populations n'ont pas pu être échantillonnées car les individus n'étaient plus présents lors des échantillonnages génétiques ou de fitness. On pourrait d'ailleurs les considérer comme éteintes. Pour les deux autres populations, le nombre d'individus peut être plus important que ne laisse supposer la surface occupée. Notamment, pour le site de Kelmis (Réserve de la Calamine; 0.4 m<sup>2</sup>), le nombre d'individus est au moins supérieur à 15 – 20 individus. En effet, aucune difficulté d'échantillonnage n'a été éprouvée tant pour la génétique, que pour le fitness sur cette population. En fait, sur ces petits sites (et dans certaines zones de sites de tailles moyennes comme à Theux), la pensée est présente sous forme d'individus isolés, épars (contrairement aux taches denses d'individus qu'elle fait sur certains grands sites). Vu la faible



distance de propagation par clonalité et la faible surface occupée par un individu, le nombre d'individus total est sans doute supérieur à ce qu'indique la surface. Néanmoins, on devrait s'attendre à observer de fortes variations des paramètres de diversité génétique et du succès reproducteur en fonction de la taille des populations, vu leur grande variation. Néanmoins, nous n'avons pas observé d'effet de la taille des populations sur la diversité génétique alors que d'autres études en RAPD ont montré cette relation (Chapitre 4). En ce qui concerne le succès reproducteur, nous avons examiné deux composantes: la production de graines et le taux de germination (Chapitre 3). Nous n'avons pas mis en évidence de relation entre la taille des populations et la production de graines. Nous n'avons d'ailleurs pas plus de corrélation entre la diversité génétique et la production de graines. Le taux de germination est par contre positivement corrélé avec la taille des populations. Cette diminution du taux de germination dans les petites populations pourrait être due aux effets de la consanguinité. Cette thèse n'est pas soutenue par l'analyse de la diversité génétique, les petites populations ne présentant pas une diversité génétique plus faible que les grandes populations. Néanmoins, des études (Menges 1991, Mahy et Jacquemart 1999) ont également montré que les effets de la consanguinité se marquent de façon plus importante sur les premières étapes du développement des plantes, comme la germination, car c'est notamment à ce moment là que de nombreux gènes essentiels sont exprimés pour la première fois (Mahy et Jacquemart 1999). Ce stade du cycle est sans doute plus critique et devra être traité avec attention pour la mise en place de stratégies de conservation.

Certains auteurs ont montré que les effets liés aux petites populations peuvent aussi se manifester sur certains stades critiques du développement bien avant que se manifestent les effets génétiques (Lande 1988, Ouborg et Van treuren 1995, Morgan 1998), notamment suite à l'effet "Allee". Nous avons également constaté que l'hypothèse déterministe de l'effet "Allee" sur le succès reproducteur n'était pas vérifiée (Chapitre 3). La densité influence bien le succès reproducteur mais inversement à ce que prédit l'effet "Allee" bien que l'espèce soit majoritairement allogame. Cela pourrait résulter d'un effet de compétition pour le pollen. En conclusion, des populations de petites tailles et de faibles densités n'apparaissent donc pas, en général, comme un facteur défavorable au maintien des populations de *V. calaminaria*.

La connectivité a été mesurée par l'indice IFM (Hanski 1994). L'indice IFM n'est pas corrélé avec la diversité génétique des populations ( $r_s = 0.297$ ,  $P = 0.407$ ). Sans doute que les flux de gènes au sein des populations entre patchs génétiquement non liés, la reproduction principalement sexuée, la banque de graines importante et une dynamique démographique suffisante permettent de maintenir cette diversité, indépendamment des flux de gènes. Par

contre, nous avons montré que l'indice IFM est fortement corrélé avec la production de graines et marque une tendance à la corrélation assez nette avec le taux de germination (Chapitre 3). L'isolement semble donc avoir un impact important sur le succès reproducteur de l'espèce. De même, nous avons obtenu une tendance assez nette entre l'indice  $F_{st}$  et l'indice IFM ( $r_p = -0.522$ ,  $P = 0.122$ ). Ceci indique que l'indice IFM correspond assez bien à une réalité de flux de gènes et d'isolement génétique. Des flux de gènes plus importants semblent donc avoir un impact positif sur le succès reproducteur de l'espèce. Néanmoins, une corrélation positive est également obtenue entre l'indice IFM et les deux ratios d'éléments du sol (Zn/Ca:  $r_s = -0.738$ ,  $P = 0.029$ ; Ca/Mg:  $r_s = 0.690$ ,  $P = 0.047$ ). Comme ces deux ratios ont une influence sur le succès reproducteur, il n'est pas évident de distinguer les effets positifs liés à l'environnement et aux flux de gènes. Des comptages du nombre d'ovules et des études en conditions contrôlées de l'impact de l'environnement sur le succès reproducteur permettraient peut-être de séparer les deux effets.

Au final, la viabilité des populations de *V. calaminaria* ne semble pas être affectée par des tailles de populations très petites et de densités faibles. L'isolement a sans doute un rôle plus important via son impact sur le succès reproducteur. Deux explications peuvent être envisagées. Soit les événements de destruction et de réduction de certaines populations sont trop récents pour se marquer au niveau génétique mais se marquent déjà sur le succès reproducteur de l'espèce en affectant les stades précoces du développement. Soit *V. calaminaria* ne réagit pas comme les autres espèces rares car les éléments provoquant (petites populations et isolement) font partie de ses caractéristiques intrinsèques et l'espèce y est adaptée. Notamment, comme déjà souligné auparavant, la dynamique démographique au sein des populations (Nei *et al.* 1975), une banque de graines importante (Obs. Perso.) et une reproduction majoritairement sexuée doivent avoir permis à l'espèce de maintenir une diversité génétique et un succès reproducteur suffisant. Un manque de corrélation entre la taille des populations, la diversité génétique et la "fitness" a été rapporté de façon similaire sur d'autres espèces se développant dans des habitats naturellement petits, isolés et fragmentés comme des sites naturels métallifères, des sites à sols salins, des habitats alpins ou des espèces d'îles (Krüger *et al.* 2002, Mattner *et al.* 2002, Pluess et Stöcklin 2004b, Leimu et Mutikainen 2005). Les différences de succès reproducteur observées entre les populations résultent alors des variations de conditions environnementales.

### 6.3 Impact de l'histoire des populations

La question de la conservation des populations récentes résultant de la pollution humaine est de première importance. Nous n'avons pas montré de différence de taille de populations significative entre anciennes et récentes populations (Test t,  $P = 0.114$ ). Cette absence de différence significative résulte essentiellement de la grande variation de la taille des populations. Les populations récentes sont en moyenne quasi 10 fois plus grandes que les anciennes et elles représentent 89.5 % de la superficie occupée par *V. calaminaria* en Région Wallonne. Ces sites apparaissent donc primordiaux en terme de surface. Mais qu'en est-il pour les autres facteurs importants pour la conservation ? Dans le chapitre 1, nous avons posé l'hypothèse que les populations récentes sont susceptibles d'être différentes tant sur le plan de la variation génétique (effet fondation, isolement important) que du comportement des populations (dynamique démographique, clonalité accrue, diminution de la "fitness").

Au niveau génétique, nous avons montré que les sites récents présentaient une diversité génétique similaire aux sites anciens. Aucun effet de fondation n'a donc pu être détecté. Par contre, nous avons montré que les populations récentes présentaient une différenciation génétique ( $F_{st}$ ) inférieure aux populations anciennes. Ces deux constatations suggèrent que les populations récentes se sont formées par plusieurs événements de colonisation à partir de plusieurs populations sources ('migrant pool' modèle de Slatkin 1977). L'indice IFM de connectivité largement supérieur dans les populations récentes (moyenne IFM des populations, anciennes: 1603, récentes: 99610;  $P < 0.001$ ) suggère aussi que l'isolement entre celles-ci est plus faible. Cet isolement plus faible favorise sans doute les flux de gènes entre les populations récentes. Ces flux de gènes plus importants pourraient également contribuer à homogénéiser génétiquement les populations récentes (diminution du  $F_{st}$ ) et à augmenter leur diversité génétique. Enfin, nous avons également montré que la structure génétique spatiale au sein des populations n'était pas différente entre populations ancienne et récente. La population ancienne étudiée montre une clonalité légèrement plus importante. L'extension démographique importante dans les populations récentes n'est donc pas due à la clonalité, celle-ci n'étant pas un moyen de reproduction important pour l'espèce. Le succès reproducteur élevé et une croissance démographique rapide ont sûrement contribué à l'augmentation de la diversité génétique des populations récentes (Nei *et al.* 1975), même si celles-ci se sont formées au départ d'un nombre limité d'individus, comme à Prayon (Lefèbre, Comm. Perso.).

Au niveau des deux paramètres du succès reproducteur, les populations récentes montrent des niveaux significativement supérieurs aux anciennes populations. Ces résultats ne sont pas congruents avec ce qui est observé au niveau de la diversité génétique. Nous avons déjà vu que la taille des populations n'explique pas les variations de succès reproducteur. Par contre, deux paramètres environnementaux (ratio Zn/Ca et Ca/Mg) influencent nettement le succès reproducteur, surtout pour Ca/Mg. Cependant, aucune différence entre les populations anciennes et récentes n'est observée pour le ratio Ca/Mg ( $P = 0.253$ ) et pour le ratio Zn/Ca ( $P = 0.08$ ). Les sites récents apparaissent ainsi légèrement moins toxiques, expliquant sans doute en partie les différences obtenues. Néanmoins, d'autres paramètres environnementaux pourraient également contribuer à cette différence. Ainsi, les sites calaminaires sont considérés comme assez pauvres en Azote et Phosphore (Chapitre 1). Cette constatation est surtout valable pour les sites anciens. Sur les sites récents, particulièrement sur les sites tertiaires, les conditions pourraient être plus riches et donc plus favorables à la croissance et la reproduction de *V. calaminaria*. Seules des études plus approfondies pourraient confirmer ce fait. Enfin, l'important isolement géographique et génétique des populations anciennes pourrait influencer négativement le succès reproducteur de ces populations (Wolf et Harrison, 2001). A l'inverse, l'extension démographique rapide dans les récentes populations associée à des flux de gènes potentiellement plus importants ( $F_{st}$  plus faible et IFM plus élevé) pourrait favoriser le succès reproducteur de ces populations (Leimu et Mutikainen 2005). En effet, l'apport de gènes extérieurs contrecarre la consanguinité et améliore la "fitness". On peut également émettre l'hypothèse que le mélange d'individus provenant de plusieurs populations et l'apport répété d'individus lors de la formation des populations récentes aient provoqué l'apparition de génotypes au succès reproducteur supérieur par "outbreeding" (Ellstrand et Elam 1993).

En conclusion, nous voyons que l'histoire des populations (événement de colonisation), comme trouvé par Leimu et Mutikainen (2005) sur *Vincetoxicum hirundinaria* (espèce d'archipel ayant colonisé certaines îles récemment), influence fortement la survie de l'espèce tant par le biais de son succès reproducteur que par les modifications génétiques qu'elle engendre. Il est donc primordial d'en tenir compte pour la conservation.

## 6.4 Implications et pistes pour la conservation

### 6.4.1 L'apport scientifique

La protection des populations d'une espèce menacée ou rare est la clé de la préservation de l'espèce elle-même. Les efforts de conservation doivent donc cibler les populations (Primack 1998). Pour *V. calaminaria*, nous pouvons même aller plus loin. En effet, de nos résultats, il apparaît clairement que la protection de *V. calaminaria* est étroitement liée à la protection des sites calaminaires. La destruction, notamment par la réhabilitation, des sites calaminaires entraîne la disparition directe de l'espèce, celle-ci ne se développant pas en dehors des sites calaminaires. Il apparaît donc qu'avant de prendre des mesures de conservation particulières pour *V. calaminaria*, il faut protéger les sites. C'est d'ailleurs ce qui a dû être réalisé dans le cadre de Natura 2000. Les "Pelouses calaminaires du *Violetalia calaminariae*" (code habitat 6130) étant reprises dans l'Annexe 1 de la Directive 92/43/CE Faune-Flore-Habitat (modifiée par la directive 97/62/CE), sous la pression de la Communauté Européenne, une grande majorité des sites calaminaires ont été classés sites Natura 2000.

En ce qui concerne la conservation des populations de *V. calaminaria* elle-même, la présente étude fournit des informations à ne pas négliger. Même si idéalement il serait préférable de tout conserver, d'autres facteurs (comme nous le verrons plus loin) comme la santé publique ou les contraintes économiques imposent souvent de faire des choix.

Au niveau de la structure génétique des populations (Chapitre 4), la différenciation en groupes régionaux impose de développer des stratégies de conservation hiérarchiques avec la protection de populations dans chaque région. Nous avons également montré que les populations récentes ou les petites populations ne sont pas appauvries génétiquement. Elles doivent donc être intégrées dans d'éventuels plans de conservation. Nous avons également montré que les populations récentes se ressemblaient plus génétiquement que les populations anciennes. La perte d'une population récente est donc moins importante au point de vue génétique (Chapitre 4). Nous avons cependant montré que ces populations récentes représentent l'essentiel de la surface et que le succès reproducteur de l'espèce y est plus important. En plus, ces populations, au vu d'une pollution parfois différente et d'un mixage de gènes de plusieurs sources fournissent des ensembles génétiques au potentiel évolutif peut-être différent. Les populations anciennes isolées sont généralement distinctes génétiquement et représentent donc chacune des ensembles génétiques différenciés, indispensables pour conserver l'ensemble du patrimoine génétique de l'espèce. Nous avons également montré que

la population d'Auby était peu différente des populations récentes belges et qu'elle ne présente que peu d'intérêt conservatoire au contraire de la population de *V. guesphalica* qui est un pool génétique particulier.

Nous n'avons également pas identifié de stades de reproduction critiques pour la viabilité des populations. Nous avons montré que la production de fleurs, le taux de fructification et la production de graines ne sont pas des facteurs limitants que ce soit pour les petites ou grandes populations (Chapitre 3). Cependant, le taux de germination apparaît comme plus problématique car il est réduit de plus de moitié dans certaines populations. Nous avons montré qu'il y a peu de risques que cette diminution du taux de germination soit liée à de la consanguinité. Néanmoins, il est important de tenir compte de ce stade de vie dans l'établissement de stratégies de conservation. Les résultats montrent que le succès reproducteur de l'espèce est supérieur dans les populations récentes. Les populations récentes sont donc importantes pour la conservation sur ce point alors que les populations anciennes posent plus de problèmes. Certaines mesures pourraient être prises pour améliorer le succès reproducteur (germination) des anciennes populations très isolées (e.g. Schmalgraf, Theux). Nous avons montré que l'isolement géographique (Indice IFM) pourrait avoir un impact non négligeable sur le succès reproducteur. L'introduction de nouveaux individus (via les graines) provenant d'autres populations pourrait également augmenter le recrutement déficient de certaines populations. Néanmoins, les populations anciennes apparaissent assez différentes au niveau génétique. Ces divergences génétiques représentent peut-être des adaptations locales. L'apport d'individus non adaptés aux conditions locales provenant d'autres populations peut engendrer une perte de "fitness" par dépression "d'outbreeding" (Ellstrand et Elam 1993, Mattner *et al.* 2002). Une telle mesure radicale n'est pas encore nécessaire pour l'espèce. En effet, le potentiel de graines germées (40 graines/m<sup>2</sup> dans la pire situation) apparaît encore comme suffisant pour la viabilité des petites populations. Des aides plus locales sont à préconiser. Notamment, *V. calaminaria* possède une banque de graines assez importante (environ 900 graines/m<sup>2</sup>, Bizoux non publié). En favorisant la germination de graines du sol (mises en lumière par étrépage), on pourrait augmenter le nombre de germinations et partiellement faire face à un manque de recrutement local. Cette banque de graines apparaît également comme très utile dans des mesures de restauration de zones détruites ou envahies par des graminées sociales ou des plantes non métalphytes. En effet, un certain nombre de sites ont été partiellement détruits par l'apport de déblais divers (terre, déchet de jardinage, ...). Ces déblais ont entraîné la disparition de la flore calaminaire suite à une modification des

conditions du substrat. L'enlèvement de ces déblais associé à un étrépage permettrait la restauration des conditions calaminaires ainsi que des populations de la pensée calaminaire.

Enfin, au sein des populations, l'étude de la structure génétique spatiale (Chapitre 5) fournit également des indications pour la sélection d'individus pour des transplantations dans un but de restauration de populations partiellement ou totalement détruites. La taille de patch suggère d'éviter de collecter des individus à moins de 4 m les uns des autres. Cette règle est également valable pour la collecte d'individus pour une conservation ex-situ. Cette taille de patch permet de définir la taille d'unité de conservation au sein des populations. Les résultats de cette étude ont également mis en évidence des différences significatives génétiques entre sous populations au sein d'une grande population. Ceci implique que d'une part la collecte d'individus doit se réaliser dans les différentes sous populations et que d'autre part, la destruction d'une partie des grandes populations récentes peut entraîner la perte de variation génétique. Il est donc important lors de la conservation de garder les populations dans leur entièreté.

En conclusion, les populations de *V. calaminaria* apparaissent viables et l'espèce ne semble pas directement menacée par des facteurs intrinsèques (diversité génétique, succès reproducteur,...), tant que son habitat n'est pas détruit. On remarque nettement l'importance des populations récentes en terme de conservation et ce pour l'ensemble des points étudiés. Ces populations doivent donc être intégrées dans la conservation de l'espèce bien qu'elles posent plus de problèmes par rapport à la population humaine parce qu'elles se trouvent dans des zones plus densément peuplées. Les populations anciennes devraient toutes être protégées de façon intégrale, vu les faibles surfaces qu'elles représentent, afin d'éviter de nouvelles destructions car elles sont le patrimoine génétique originel de l'espèce. Des mesures locales devraient être prises pour favoriser le succès reproducteur (taux de germination) dans ces anciennes populations.

### 6.4.2 *Intégration d'autres paramètres*

Si la mise en place et l'élaboration de stratégies de conservation gagnent énormément d'études scientifiques, comme nous l'avons montré, la faisabilité de la conservation va dépendre d'autres facteurs et contraintes plutôt d'ordre social, économique, voire de santé publique.

Tout d'abord, les possibilités de conservation varient selon le type de sites. Les sites anciens sont d'origine naturelle et n'ont donc, à priori, aucune raison de disparaître, même si souvent exploités par l'industrie minière, ils ont été fortement dérangés et perturbés. Ils

présentent parfois des aspects peu esthétiques, constitués de remblais ou d'autres substrats perturbés, ce qui peut constituer une menace car les autorités ont souvent tendance à vouloir les réhabiliter. En général, ils ne posent pas de problème de santé publique. Les sites nouveaux sont eux d'origine industrielle. Or, à l'heure actuelle, les industries à l'origine de cette pollution ont soit cessé leurs activités soit développé des techniques moins préjudiciables à l'environnement. Par conséquent, on est en droit de se demander pourquoi conserver des sites pollués qui posent dans certain cas des problèmes de santé publique. Une étude déterminant les sites qui posent le plus de problèmes permettrait d'intégrer ce paramètre dans la stratégie de conservation. Les zones les plus problématiques pourraient être délimitées, voire interdites au public. Associées à de l'information, de telles mesures empêcheraient d'une part la destruction des populations et d'autre part certains problèmes de santé liés à une présence excessive de la population humaine sur les sites (par exemple, les enfants jouant sur les sites). Au pire, la destruction partielle ou totale de sites trop dangereux pourrait être envisagée dans la stratégie globale de conservation.

Au niveau économique, il paraît évident que l'acquisition et la protection d'un site constituent un coût pour la société. En général, plus un site sera grand, plus il coûtera. Ce facteur n'est donc pas à négliger. Mais la conservation peut également produire des profits et des gains. Ceci est d'autant plus vrai pour les sites calaminaires pour lesquels on évite ainsi les coûts de la réhabilitation.

Le type de propriétaires influence également les possibilités de conservation. Un propriétaire privé n'aura pas les mêmes possibilités d'action qu'un propriétaire public. Il est probable aussi qu'il réagira de façon plus réservée à la mise en protection de ses terres, surtout si cela représente pour lui une perte économique. Plus de la moitié des sites appartiennent à des propriétaires privés, c'est donc un critère à ne pas négliger.

D'autres contraintes interviennent, elles sont résumées dans la table 6.1 tiré de Brevers (2003). En ce qui concerne le statut de protection, les sites à privilégier sont bien entendu ceux qui ont un statut encore insuffisant. La majorité des sites ont été répertoriés comme site Natura 2000. Quelques populations ou parties de populations ne sont pas reprises, principalement sur Angleur où les populations des sites de Sur le Tiers, la friche industrielle et le parc de la vieille montagne ont été omises. Néanmoins, pour certains sites, au vue de leur fréquentation et des menaces cela n'est pas suffisant pour l'instant. Des sites sont dès lors encore vulnérables. Les statuts de protection sont très importants car ils servent de base légale pour justifier la protection des sites contre les agressions diverses dont la plus redoutable est sans doute le remblayage par des terres étrangères, ce qui supprime définitivement la flore



métallicole (Ertz 1998). Le classement en réserves naturelles reste donc primordial. Des efforts ont été réalisés récemment comme pour l'île aux corsaires à Angleur ou pour la halde du Casino à Kelmis. L'affectation au plan de secteur peut constituer, quant à elle, un problème pour certains sites. Le plan de secteur autorise, par exemple, la destruction complète des sites repris en zone d'habitat, en zone industrielle, en zone de services publics et d'équipements communautaires, entre autres. C'est ainsi que la végétation située aux abords de la gare de Chênée a été entièrement rasée pour construire de nouveaux quais. Tout comme le statut de protection, l'affectation au plan de secteur peut protéger certains sites de l'urbanisation ou de la réhabilitation lorsqu'ils sont placés en zones d'espaces verts par exemple.

Enfin, l'identification et l'estimation du poids des menaces qui pèsent sur certains sites sont des éléments à considérer. Plus un site est menacé, plus il devrait acquérir un statut de protection rapidement. Les menaces doivent être intégrées dans un plan de conservation. L'observation montre que l'un des sites les plus menacés est Prayon. Il est très fréquemment perturbé par les amateurs de motocross, les dépôts d'immondices et surtout par le projet de liaison autoroutière dont le tracé prévoit le passage par le piton de La Rochette. Son accès au public a été récemment interdit ce qui a permis de stopper le dépôt d'immondices. Par contre, il devrait absolument acquérir au plus vite un statut de protection qui permettrait d'éviter le passage de l'autoroute à cet endroit. C'est primordial car ce site est le plus grand site calaminaire de Belgique. Le tracé ne détruirait pas directement les populations mais entraînerait des perturbations et des nuisances très importantes sur celles-ci malgré son classement en site Natura 2000. Le site de Bois-les-Dames est également menacé par le même projet. D'autres sites comme la prairie du jumping de Chaudfontaine, la voie ferrée à Chênée, la friche à Angleur sont également très menacés. Oublié dans Natura 2000, l'ancien jumping de Chaudfontaine est perturbé pour ne pas dire détruit par l'organisation annuelle d'un jumping. Les autorités communales de Chaudfontaine et les organisateurs du jumping devraient être informés de l'intérêt du terrain où ce concours est organisé afin d'éventuellement trouver un autre endroit pour organiser cette manifestation. Ce site, de même que l'ensemble des sites de Chaudfontaine et de Trooz, ne possède aucun statut de protection. L'attention des décideurs devrait donc être attirée au plus vite sur ce point afin de combler ces lacunes.

Tableau 6.1: Hiérarchisation des sites sur base des différents facteurs qui interviennent dans la définition de stratégies de conservation. Acc.: Accessibilité, +: facile, 0: moyenne, -: difficile ; Fréq.: Taux de fréquentation par le public, +: fréquente, 0: moyenne, -: rare ; Déchets: Présence éventuelle de déchets sur le site, +: problèmes de dépôts de déchets, 0: site moyennement propre, -: pas de problème de dépôts de déchets ; Menaces: poids des diverses menaces pesant sur le site ; Statut: Protection du site, +++: site sans statut ou possédant un statut de protection insuffisant, ++: site moyennement protégé, +: site suffisamment protégé ; P.S.: Affectation au plan de secteur, +++: site dont l'affectation autoriserait une destruction potentielle complète, ++: site dont l'affectation est moyennement adaptée, +: site dont l'affectation assure une protection relative.

Populations	Type de populations	Acc.	Fréq.	Déchets	Menaces	Statut	P.S.
Prayon	Récente	-	0	0	+++	+++	++
Jumping Chaudfontaine	Récente	+	+	-	+++	+++	+++
Ile aux corsaires	Récente	-	-	0	+	+	+++
Gare Chênée	Récente	0	0	+	+++	+++	+++
Plombières	Ancienne	+	+	-	++	++	+++
Fond de forêt	Récente	+	-	-	+	+++	++
Friche Angleur	Récente	+	+	+	+++	++	++
Vieille Montagne	Récente	+	+	-	+	++	++
Sur Le Tiers	Récente	+	+	0	+	++	+
Halde Casino à Kelmis	Ancienne ?	+	+	+	+++	+	+++
Bois les Dames	Récente	-	0	-	++	+++	+
Jardin Prayon	Récente	+	0	-	+	++	+++
Streupas	Récente	+	+	-	++	+	+
Kelmis réserve	Ancienne	0	0	+	++	+	++
Petit schmalgraf	Ancienne	0	-	-	+	++	+++
Ru du Wilcour	Ancienne	-	-	-	++	+++	+++
schmalgraf	Ancienne	0	+	0	++	+++	+
rabotrath	Ancienne	-	-	-	+	+	+++
Terbruggen	-	-	-	-	+	++	+++
Tumulus à Theux	Ancienne ?	-	-	-	+	++	+++
Rocheux à Theux	Ancienne	0	-	0	+	+	+

La voie ferrée et les abords de la gare de Chênée sont aussi malheureusement fort menacés étant donné l'absence totale de statut de ce site, y compris Natura 2000. Cette menace s'est d'ailleurs concrétisée puisqu'une importante partie du site a été détruite. La SNCB devrait être informée de l'intérêt de la végétation qui pousse aux abords de la gare de Chênée. Le plan fédéral de développement durable (PFDD) prévu pour la période 2000-2004 spécifie que la gestion des terrains qui dépendent de l'Etat doit être réalisée de manière à privilégier la biodiversité le long des infrastructures fédérales, y compris le long des talus de chemin de fer. Ce PFDD peut donc servir de justification pour la protection de la végétation calaminaire. Cela semble d'autant plus réalisable que les mesures de protection ne risquent pas d'engendrer de problèmes de sécurité ou de circulation. La friche à Angleur appartient en grande partie à l'usine UMICORE. Informée de la valeur du site suite à la mise en place de Natura 2000, elle a garanti de conserver le site tel quel (Brevers, Comm. Perso.). Néanmoins, cette population n'est pas reprise totalement en Natura 2000 et récemment, UMICORE a détruit la partie du site lui appartenant en créant un parking!

D'autres sites sont essentiellement menacés par leur fréquentation importante en promeneurs comme Plombières, Schmalgraf, Sur le tiers. Sur ces sites, une simple information permettrait peut-être de protéger les populations. L'intérêt du public pourrait être éveillé par des panneaux didactiques, l'organisation d'excursions ou d'activités scolaires didactiques sur les terrains calaminaires. Plus un site sera accessible et fréquenté par un public non averti, plus il risquera de subir des nuisances. L'accessibilité des sites et leur fréquentation par le public sont des critères auxquels on ne pense pas toujours mais qui sont déterminants, surtout lorsque l'aspect du site s'en ressent suite à l'abandon de détritrus par les promeneurs ou suite à des dépôts d'immondices par le voisinage. Plus le site sera confronté à des problèmes de dépôts de déchets, plus les actions à mener pour résoudre ou éviter ces problèmes devront être énergiques. Quoiqu'il en soit, le public devrait être informé au maximum de l'intérêt des sites calaminaires. Le site de Plombières doit être impérativement protégé totalement afin d'éviter la disparition de l'importante population de *V. calaminaria* qu'il abrite. Une partie de celui-ci a déjà été détruite par réhabilitation (création du Parc communal), une autre petite partie du site est en réserve et fermée au public et le reste, qui comprend l'essentiel de la population de *V. calaminaria* fait partie du Parc communal et est très fréquenté.

D'autres sites, comme Le Rocheux qui sont peu fréquentés, sur lesquels ne pèsent pas de menaces particulières et qui parfois bénéficient d'un statut de protection adapté, nécessitent par contre moins d'attention. Pour contribuer au maintien de la végétation calaminaire dans les prairies agricoles, il faudrait diminuer la fertilisation et pratiquer le fauchage tardif ou le pâturage extensif. En effet, le fauchage pratiqué en juin empêche la dissémination de la plupart des plantes car elles n'ont pas encore eu le temps d'arriver à maturité (Beckers 1997).

Enfin, quelques sites ont vu leur menace disparaître. Ainsi, l'Ile aux corsaires était très accessible et fréquentée. Son affectation au plan de secteur ne permettait pas d'assurer les objectifs de conservation. Son rachat, sa mise en réserve et son aménagement (fermeture par grillage, accès limité au public lors d'excursion, panneaux didactiques ...) par l'association Natagora asbl ont sauvé le site d'une destruction totale (le site avait déjà été détruit partiellement par la station d'épuration, Graitson 2003).

En conclusion, il est donc important, en parallèle des études scientifiques, de s'informer sur le contexte et sur un certain nombre de facteurs connexes qui vont influencer la stratégie de conservation et le choix des populations à conserver. En effet, certains d'entre eux peuvent empêcher la conservation de populations. Il faudra alors trouver des compromis. Dans le point 6.4.2, nous avons montré que les populations récentes sont souvent plus

## Chapitre 6: Discussion générale

menacées et moins protégées que les populations anciennes. Cette constatation est fâcheuse puisque nous avons mis en évidence, lors de notre étude scientifique, que les populations récentes étaient très importantes pour la conservation. Il en ressort donc que des efforts doivent être consentis, comme pour l'Île aux corsaires, pour mettre en réserve certaines populations (comme Prayon) après évaluation de leur éventuel danger pour la santé publique.

## Références

1. Agren J. 1996. Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*. *Ecology*. **77**: 1779-1790.
2. Alexander J.A., Liston A. & Popovich S.J. 2004. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* Fabaceae. *American Journal of Botany*. **91**: 2004-2012.
3. Antonovics J., Bradshaw A.D. & Turner R.G. 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research*. **7**: 1-85.
4. Arafeh R.M.H., Sapir Y., Shmida A., Iraki N., Fragman O. & Comes H.P. 2002. Patterns of genetic and phenotypic variation in *Iris haynei* and *Iris atrofusca* Iris sect. *Oncocyclus* = the royal irises along an ecogeographical gradient in Israel and the West Bank. *Molecular Ecology*. **11**: 39-53.
5. Auge H., Neuffer B., Erlinghagen F., Grupe R. & Brandl R. 2001. Demographic and random amplified polymorphic Dna analyses reveal high levels of genetic diversity in a clonal violet. *Molecular Ecology*. **10**: 1811-1819.
6. Auquier P. 1964. Les *Festuca* des terrains calaminaires de la Wallonie septentrionale. *Bulletin de la Société Royale Botanique Belge*. **97**: 99-129.
7. Bartish I.V., Jeppsson N. & Nybom H. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic Dna RAPD markers. *Molecular Ecology*. **8**: 791-802.
8. Baumbach H. & Hellwig F.H. 2003. Genetic variation within and among metal-tolerant and non-tolerant populations of *Armeria maritima* Mill. Willd. *s.l.* Plumbaginaceae in Central and Northeast Germany. *Plant Biology*. **5**: 186-193.
9. Beattie A.T. 1971. Pollination mechanisms in *Viola*. *New Phytologist*. **70**: 343-360.
10. Beattie A.T. 1972. The pollination ecology of *Viola*. 2, Pollen loads on insect-visitors. *Watsonia*. **9**: 13-25.
11. Beattie A.J. & Lyons N. 1975. Seed dispersal in *Viola* (Violaceae): Adaptations and strategies. *American Journal of Botany*. **62**: 714-722.
12. Beckers R. 1997. *Recherche et propositions de gestion des sites favorables à la végétation calaminaire dans le cadre du plan communal de développement de la nature de Welkenraedt*. Mémoire de fin d'études, Institut Supérieur Industriel, Huy, Belgique.

13. Begon M., Harper J.L. & Townsend C.R. 1990. *Ecology: Individuals, populations and communities*. 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Scientific Publications, Boston.
14. Begon M., Harper J.L. & Townsend C.R. 1996. *Ecology. Individuals, populations and communities*. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
15. Bisteau E. & Mahy G. 2005. A landscape approach for the study of calcareous grassland plant communities. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. **9**: 93-99.
16. Bizoux J-P., Brevers F., Meerts P., Graitson E. & Mahy G. 2004. Ecology and conservation of Belgian populations of *Viola calaminaria*, a metallophyte with a restricted geographic distribution. *Belgian Journal of Botany*. **137**: 91-104.
17. Blamey M. & Grey-Wilson C. 1991. *La flore d'Europe occidentale*. Arthaud, Paris.
18. Brevers F. 2003. *Ecogéographie et conservation des populations de Viola calaminaria DC. Lej. en Région Wallonne*. Mémoire de fin d'études, Faculté des sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgique.
19. Brown G. 1994. Soil factors affecting patchiness in community composition of heavy metal contaminated areas of Western Europe. *Vegetatio*. **115**: 77-90.
20. Brown G. 1995. The effects of lead and zinc on the distribution of plant species at former mining areas of Western Europe. *Flora*. **190**: 243-249.
21. Brown G. 2001. The heavy metal vegetation of northwestern mainland Europe. *Botanische Jahrbücher für Systematik*. **123**: 63-110.
22. Broyles S.B., Schnabel A. & Wyatt R. 1994. Evidence for long distance pollen dispersal in milkweeds (*Asclepias exaltata*). *Evolution*. **48**: 1032-1040.
23. Brussard P.F. 1991. The role of ecology in biological conservation. *Ecological Applications*. **1**: 6-12.
24. Bussell J.D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic Dna RAPD diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*. **8**: 775-789.
25. Byers D.L. & Waller D.M. 1999. Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **30**: 479-513.
26. Cabin R.J. 1996. Genetic comparisons of seed bank and seedling populations of a perennial desert mustard, *Lesquerella fendleri*. *Evolution*. **50**: 1830-1841.
27. Charlesworth D. & Charlesworth B. 1987. Inbreeding and its evolution consequences. *Annual review of ecology and systematics*. **18**: 237-268.

28. Chung M.G. & Chung M.Y. 1999. Spatial genetic structure of clonal and sexual reproduction in a population of *Abeliophyllum distichum* (Oleaceae), an endangered monotypic genus. *Genes & Genetic Systems*. **74**: 9-14.
29. Chung M.Y., Nason J.D. & Chung M.G. 2004. Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibracteata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*. **91**: 52-57.
30. Colas B., Olivieri I. & Riba M. 2001. Spatio-temporal variation of reproductive success and conservation of the narrow-endemic *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). *Biological conservation*. **99**: 375-386.
31. Cottenie A., Kiekens L. & Verloo M. 1975. Principles of soil and substrate analysis with regard to mobility of nutrient element. *Pédologie*. **25**: 134-142.
32. de Langhe P.J. & Norton D.A. 2004. The ecology and conservation of *Kunzea sinclairii* Myrtaceae, a naturally rare plant of rhyolitic rock outcrops. *Biological Conservation*. **117**: 49-59.
33. Debussche M., Grandjanny M., Debussche G. & Affre L. 1996. The ecology of an endemic and rare species with a fragmented distribution: *Cyclamen balearicum* Willk in France. *Acta Botanica Gallica*. **143**: 65-84.
34. Dinsdale J., Dale P. & Kent M. 1997. The biogeography and historical ecology of *Lobelia urens* L. the heath lobelia in southern England. *Journal of Biogeography*. **24**: 153-175.
35. Doust L.L. & Doust J.L. 1995. Wetland management and conservation of rare species. *Canadian Journal of Botany*. **73**: 1019-1028.
36. Dubois S., Cheptou P.O., Petit C., Meerts P., Poncelet M., Vekemans X., Lefèbvre C. & Escarré J. 2003. Genetic structure and mating systems of metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*. **157**: 633-641.
37. Dubourgrier H.G., Petit D., Derau A. & Logeoy C. 2001. *Le phytomanagement: Elements de synthèses*. Pôle de compétence des sites et sédiments pollués, Lille, France.
38. Ducouso A., Petit D., Valero M. & Vernet P. 1990. Genetic variation between and within populations of a perennial grass: *Arrhenatherum elatius*. *Heredity*. **65**: 179-188.
39. Duvigneaud J. 1976. Les critères d'appréciation de la valeur biologique d'un site: exemple du versant gauche de la vallée de la Vesdre à Ninane et Chaudfontaine. *Natura Mosana*. **29**: 102-117.

40. Duvigneaud J., Auquier P. & Lambinon J. 1979. La vallée du Lontzenerbach à Hergenrath (province de Liège, Belgique). *Bulletin de la Commission Royale des Monuments et Sites*. **8**: 217-231.
41. Duvigneaud J. 1982. La halde calaminaire du Rocheux à Theux. Une nouvelle réserve naturelle d'Ardenne et Gaume. *Parc Nationaux*. **37**: 117-138.
42. Duvigneaud J. & Jortay A. 1987. Un site intéressant de la région liégeoise: la partie méridionale du vallon des Fonds de Forêt Forêt et Magnée, province de liège. *Les Naturalistes Belges*. **68**: 33-48.
43. Duvigneaud J., Saintenoy-Simon J. & Pauquet F. 1993. Une réserve naturelle d'Ardenne et Gaume: la pelouse calaminaire située au sud du parc communal de Kelmis-La Calamine. *Parcs Nationaux*. **48**: 66-76.
44. Duvigneaud J. & Saintenoy-Simon J. 1996. Le site calaminaire de Plombières. *Ardenne et Gaume*. **51**: 5-9.
45. Duvigneaud J. & Saintenoy-Simon J. 1998. Les haldes calaminaires de Plombières province de Liège, Belgique. *Les Naturalistes Belges*. **79**: 24-32.
46. Eckert C.G., Manicacci D. & Barrett S.C.H. 1996. Genetic drift and founder effect in native versus introduced populations of an invading plant, *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Evolution*. **50**: 1512-1519.
47. Edwards A.L. & Weakley A.S. 2001. Population biology and management of rare plants in depression wetlands of the southeastern coastal plain, USA. *Natural Areas Journal*. **21**: 12-35.
48. Eisto A.K., Kuitunen M., Lammi A., Saari V., Suhonen J., Syrjasuo S. & Tikka P.M. 2000. Population persistence and offspring fitness in the rare bellflower *Campanula cervicaria* in relation to population size and habitat quality. *Conservation Biology*. **14**: 1413-1421.
49. Ellstrand N.C. & Roose M.L. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant-species. *American Journal of Botany*. **74**: 123-131.
50. Ellstrand N. C. & Elam R.. 1993. Population genetic consequences of small population size. Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **24**: 217-242.
51. England P.R., Whelan R.J. & Ayre D.J. 2003. Effects of seed bank disturbance on the fine-scale genetic structure of populations of the rare shrub *Grevillea macleayana*. *Heredity*. **91**: 475-480.



52. Ennos R.A., French G.C. & Hollingsworth P.M. 2005. Conserving taxonomic complexity. *Trends in Ecology & Evolution*. **20**: 164-168.
53. Epperson B.K. 1993. Recent advances in correlation studies of spatial patterns of genetic variation. *Evolutionary Biology*. **27**: 95-155.
54. Eriksson O. 1989. Seedling dynamics and life histories in clonal plants. *Oikos*. **55**: 231-238.
55. Eriksson O. 1993. Dynamics of genets in clonal plants. *Trends in Ecology & Evolution*. **8**: 313-316.
56. Eriksson O. & Froborg H. 1996. "Windows of opportunity" for recruitment in long-lived clonal plants: Experimental studies of seedling establishment in *Vaccinium shrubs*. *Canadian Journal of Botany*. **74**: 1369-1374.
57. Ernst W.H.O. 1990. Mine vegetation in Europe. pp. 285-300. *In*: Shaw A.J. ed. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, CRC Press, Florida.
58. Ernst W.H.O. 1999. Evolution of plants on soils anthropogenically contaminated by heavy metals. pp. 13-27. *In*: Van Raamsdonk L.W.D., den Nijs J.C.M. eds. *Plant evolution in man-made habitats*. Proceedings VIIth Symposium IOPB, Amsterdam. Hugo de Vries laboratory, Amsterdam.
59. Ertz D. 1998. Le petit nacré *Issoria lathonia* sur les terrains calaminaires de l'Est de la Belgique: données nouvelles sur l'écologie, l'éthologie et la chorologie de l'espèce. Réflexions sur la gestion des sites calaminaires et l'impact des lapins. *Natura Mosana*. **51**: 12-24.
60. Ertz D. & Hermanns J.F. 1998. Les sites calaminaires de l'est de la Belgique, milieu de vie du papillon *Issoria lathonia*. *Les Cahiers des Réserves Naturelles RNOB*. **13**: 15-18.
61. Escudero A., Iriando J.M. & Torres M. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*. **113**: 351-365.
62. Excoffier L., Smouse P.E. & Quattro M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among Dna Haplotypes: application to human mitochondrial Dna restriction data. *Genetics*. **131**: 479-491.
63. Fagot J. 1993. *Apport de la botanique dans la stratégie de réhabilitation des sites contaminés par les métaux lourds*. Ph.D. thesis, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique.

64. Fischer M. & Matthies D. 1998a. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American journal of botany* **85**: 811-819.
65. Fischer M. & Matthies D 1998b. Effects of population size on performance in the rare plant *Gentianella germanica*. *Journal of ecology*. **86**: 195-204.
66. Fischer M., Husi R., Prati D., Peintinger M., Kleunen M., van Schmid B. & van Kleunen M. 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* Ranunculaceae. *American Journal of Botany*. **87**: 1128-1137.
67. Freitas L. & Sazima M. 2003. Floral biology and pollination mechanisms in two viola species-from nectar to pollen flowers? *Annals of Botany*. **91**: 311-317.
68. Freville H., Colas B., Riba M., Caswell H., Mignot A., Imbert E. & Olivieri I. 2004. Spatial and temporal demographic variability in the endemic plant species *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). *Ecology*. **85**: 694-703.
69. Garland C.J. & Wilkins D.A. 1981. Effect of calcium on the uptake and toxicity of lead in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca ovina* L. *New Phytologist*. **87**: 581-593.
70. Gaston K.J. 1998. Species-range size distributions: products of speciation, extinction and transformation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. **353**: 219-230.
71. Given D.R. 1994. *Principles and practice of plant conservation*. Chapman and Hall. London.
72. Gomez C. & Espadaler X. 1998. Myrmecochorous dispersal distances: a world survey. *Journal of Biogeography*. **25**: 573-580.
73. Graiston E. 2003. *Inventaire et caractérisation des sites calaminaires en Région wallonne*. Rapport intermédiaire, G.I.R.E.A., Université de Liège, Liège.
74. Graitson E. 2004. Inventaire et caractérisation des sites calaminaires en région wallonne. *Lejeunia*. in press.
75. Groom M.J. 1998. Allee effects limit population viability of an annual plant. *American Naturalist*. **151**: 487-496.
76. Gugerli F., Eichenberger K. & Schneller J.J. 1999. Promiscuity in populations of the cushion plant *Saxifraga oppositifolia* in the Swiss Alps as inferred from random amplified polymorphic Dna RAPD. *Molecular Ecology*. **8**: 453-461.
77. Hadrys H., Balick M. & Schierwater B. 1992. Applications of random amplified polymorphic Dna RAPD in molecular ecology. *Molecular Ecology*. **1**: 55-63.

78. Haig S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*. **79**: 413-425.
79. Hamrick J.L. & Godt M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B-Biological Sciences*. **351**: 1291-1298.
80. Hangelbroek H.H., Ouborg N.J., Santamaria L. & Schwenk K. 2002. Clonal diversity and structure within a population of the pondweed *Potamogeton pectinatus* foraged by Bewick's swans. *Molecular Ecology*. **11**: 2137-2150.
81. Hanski I. 1989. Metapopulation dynamics. *Nature*. **396**: 41-49.
82. Hanski I. 1994. A practical model of metapopulation dynamics. *Journal of animal Ecology*. **63**: 151-162.
83. Hardy O.J. & Vekemans X. 2002. SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*. **2**: 618-620.
84. Hardy O.J. 2003. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation by distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology*. **12**: 1577-1588.
85. Harper J.L. 1977. *The population biology of plants*. Academic press, London.
86. Hartl D. 2000. *A primer of population genetics*. Sinauer Associates, Sunderland.
87. Heimans J. 1961 Taxonomical, phytogeographical and ecological problems round *Viola calaminaria*, the zinc violet. *Publicaties Natuurhist Genootschap Limburg*. **12**: 55-71.
88. Hendrix S.D. & Kylh J.F. 2000. Population size and reproduction in *Phlox pilosa*. *Conservation Biology*. **14**: 304-313
89. Hensen I., Oberprieler C. & Wesche K.. 2005. Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill. Ranunculaceae in Central Germany. *Flora*. **200**: 3-14.
90. Heuertz M., Vekemans X., Hausman J.F., Palada M. & Hardy O.J. 2003. Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Molecular Ecology*. **12**: 2483-2495.
91. Heywood J.S. 1991. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **22**: 335-355.
92. Heywood V.H. & Iriondo J.M. 2003. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*. **113**: 321-335.

93. Hildebrandt U., Kaldorf M. & Bothe H. 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*. **154**: 709-717.
94. Hildebrandt U., Hoef-Emden K., Backhausen S., Bothe H., Bozek M., Siuta A. & Kuta E. 2006. The rare, endemic zinc violets of Central Europe originate from *Viola lutea* Huds. *Plant systematic and evolution*. **257**: 205-222.
95. Hill M.O. 1979. *TWINSPAN. A Fortran program for arranging multivariate data in an ordered two-way table by classification of the individuals and attributes*. Cornell University, Ithaca.
96. Holsinger K.E., Lewis P.O. & Dey D.K. 2002. A bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology*. **11**: 1157-1164.
97. Holsinger K.E. & Wallace L.E.E. 2004. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*. **13**: 887-894.
98. Isaac N.J.B., Mallet J. & Mace G.M. 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. **19**: 464-469.
99. Jacquemart S. 1958. Contribution à l'écologie des haldes calaminaires Colonisation d'un milieu neuf. *Bulletin de la Société Royale Botanique Belge*. **34**: 1-28.
100. Jedrzejczyk, M., Rostanski A. & Malkowski E. 2002. Accumulation of zinc and lead in selected taxa of the genus *Viola* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. **44**: 49-55.
101. Jortay A. 1984. *Etude écologique des effets sur le couvert végétal de l'industrie du zinc à Prayon Trooz*. Ph.D. thesis, Université de Liège, Liège, Belgique.
102. Kakes P. & Everards K. 1976. Genecological investigations on zinc plants I. Genetics of flower colour in crosses between *Viola calaminaria* Lej. and its subspecies *westfalica* Lej. Ernst. *Acta Botanica Neerlandica*. **25**: 31-40.
103. Kakes P. 1977 Genecological investigations on zinc plants II. Introgression in a small population of the zinc violet *Viola calaminaria* subsp. *westfalica* Lej. Ernst. *Acta Botanica Neerlandica*. **26**: 385-400.
104. Kakes P. 1979. Genecological investigations on zinc plants III. Cytology of hybrids between *Viola calaminaria* Lej. Ernst and *Viola arvensis* Murr. *Genetica*. **51**: 135-142.
105. Kalisz S., Nason J.D., Hanzawa F.M. & Tonsor S.J. 2001. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: The roles of dispersal, mating, history, and selection. *Evolution*. **55**: 1560-1568.

106. Kang S.K. & Chung M.G. 2000. High levels of allozyme variation within populations and low allozyme divergence within and among species of *Hemerocallis* (Liliaceae). *American Journal of Botany*. **87**: 1634-1646.
107. Karp A., Isaac P.G. & Ingram D.S. 1998. *Molecular Tools for screening Biodiversity*. Chapman & Hall, Londres.
108. Kennedy M. & Gray R.D. 1993. Can ecological theory predict the distribution of foraging animals? A critical analysis of experiments on the ideal free distribution. *Oikos*. **68**: 158-166.
109. Kent M. & Coker P. 1992. *Vegetation description and analysis: a practical approach*. John Wiley and Sons Chichester, New York.
110. Krahulcova A., Krahulec F. & Kirschner J. 1996 Introgressive hybridization between a native and an introduced species: *Viola lutea* subsp. *sudetica* versus *V. tricolor*. *Folia Geobotanica and Phytotaxonomica*. **31**: 219-244.
111. Kruckeberg A. R. & Rabinowitz D. 1985. Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **16**: 447-479.
112. Krüger A.M., Hellwig F.H. & Oberprieler C. 2002. Genetic diversity in natural and anthropogenic inland populations of salt-tolerant plants: random amplified polymorphic DNA analyses of *Aster tripolium* L. (Compositae) and *Salicornia ramosissima* Woods (Chenopodiaceae). *Molecular Ecology*. **11**: 1647-1655.
113. Lakanen E. & Erviö R. 1971. A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta Agraria Fennica*. **123**: 223-232.
114. Lambinon J. & Auquier P. 1964. La flore et la végétation des terrains calaminaires de la Wallonie septentrionale et de la Rhénanie aixoise. Types chorologiques et groupes écologiques. *Natura mosana*. **16**: 113-130.
115. Lambinon J., de Langhe J.E., Delvosalle L. & Duvigneaud J. 1992. *Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché du Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines*. 4<sup>th</sup> ed. Jardin botanique national de Belgique, Meise.
116. Lambinon J., Delvosalle L. & Duvigneaud J. 2004. *Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines Ptéridophytes et Spermatophytes*. 5<sup>th</sup> ed. Jardin botanique national de Belgique, Meise.
117. Lande R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*. **241**: 1455-1460.

118. Lefèbvre C. & Vernet P. 1990. Microevolutionary processes on contaminated deposits. pp. 285-300. *In*: Shaw A.J. ed. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. CRC Press, Boca Raton.
119. Leimu R. & Mutikainen P. 2005. Population history, mating system, and fitness variation in a perennial herb with a fragmented distribution. *Conservation biology*. **19**: 349-356
120. Lejeune A.L.S. 1811. *Flore des environs de Spa*. Duvivier, Liège.
121. Lejeune A.L.S. 1824. *Revue de la flore des environs de Spa*. Duvivier, Liège.
122. Leprince E. & Erzt D. 2003. La vallée de la Gueule, des richesses insoupçonnées. *Réserves Naturelles*. **3**: 16-21.
123. Leteinturier B. 2002. *Evaluation du potentiel phytocénotique des gisements cuprifères d'Afrique centro-australe en vue de la phytoremédiation de sites pollués par l'activité minière*. Ph.D. thesis, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique.
124. Li Y.C., Roder M.S., Fahima T., Kirzhner V.M., Beiles A., Korol A.B. & Nevo E. 2000. Natural selection causing microsatellite divergence in wild emmer wheat at the ecologically variable microsite at Ammiad, Israel. *Theoretical and Applied Genetics*. **100**: 985-999.
125. Linhart Y.B. & Grant M.C. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **27**: 237-277.
126. Lönn M., Prentice H.C. & Bengtsson K. 1996. Genetic structure, allozyme habitat associations and reproductive fitness in *Gypsophila fastigiata* (Caryophyllaceae). *Oecologia*. **106**: 308-316.
127. Lopez-Pujol J., Bosch M., Simon J. & Blanche C. 2004. Allozyme diversity in the tetraploid endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). *Annals of Botany*. **93**: 323-332.
128. Lovett Doust L. & Lovett Doust J. 1995. Wetland management and conservation of rare species. *Canadian Journal of Botany*. **73**: 1019-1028.
129. Lynch M. & Milligan B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with Rapid markers. *Molecular Ecology*. **3**: 91-99.
130. Macnair M.R. & Baker A.J.M. 1994. Metal tolerance in plants: evolutionary aspects. pp. 68-86. *In*: Farago M.E. ed. *Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*. Wiley-VCH, Weinheim.
131. Macnair M. R. 2002. Within and between population accumulation genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*. **155**: 59-66

132. Mahy G. & Jacquemart A.L. 1999. Early inbreeding depression and pollen competition in *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Annals of Botany*. **83**: 697-704.
133. Mahy G., Vekemans X. & Jacquemart A.L. 1999. Patterns of allozymic variation within *Calluna vulgaris* populations at seed bank and adult stages. *Heredity*. **82**: 432-440.
134. Mahy G., Bruederle L.P., Connors B., van Hofwegen M. & Vorsa N. 2000. Allozyme evidence for genetic autopolyploidy and high genetic diversity in tetraploid cranberry, *Vaccinium oxycoccos* (Ericaceae). *American Journal of Botany*. **87**: 1882-1889.
135. Maquinay A. & Ramaut J.L. 1960. La teneur en zinc des plantes du *Violetum calaminariae*. *Les Naturalistes Belges*. **41**: 265-273.
136. Mattner J., Zawko G., Rossetto M., Krauss S.L., Dixon K.W. & Sivasithamparam K. 2002. Conservation genetics and implications for restoration of *Hemigenia Exilis* (Lamiaceae), a serpentine endemic from Western Australia. *Biological Conservation*. **107**: 37-45.
137. Maxted N. 1999. Ecogeography and genetic conservation. pp. 53-66. In: Bennett S.J. & Cocks P.S. eds. *Genetic resources of Mediterranean pasture and forage legumes*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
138. McCauley D.E., Raveill J. & Antonovics J. 1995. Local founding events as determinants of genetic structure in a plant metapopulation. *Heredity*. **75**: 630-636.
139. McKay J.K., Christian C.E., Harrison S. & Rice K.J. 2005. "How local is local?" - A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology*. **13**: 432-440.
140. Menges E.S. 1991. Seed germination percentage increases with population size in fragmented prairie species. *Conservation biology*. **5**: 158-164.
141. Menges E. 2000. Population viability analysis in plants: challenges and opportunities. *Trends in Ecology and evolution*. **15**: 51-56.
142. Mengoni A., Gonnelli C., Galardi F., Gabbrielli R. & Bazzicalupo M. 2000. Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene Paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a random amplified polymorphic Dna analysis. *Molecular Ecology*. **9**: 1319-1324.
143. Moilanen A. & Nieminen M. 2002. Simple connectivity measures in spatial ecology. *Ecology*. **83**: 1131-1145.
144. Morgan J.W. 1998. Effects of population size on seed production and germinability in an Endangered, Fragmented grassland plant. *Conservation Biology*. **13**: 266-273.

145. Mustajarvi K., Siikamäki P., Rytönen S. & Lammi A. 2001. Consequences of plant population size and density for plant-pollinator interactions and plant performance. *Journal of ecology*. **89**: 80-87.
146. Hamrick J.L. & Nason J.D. 1996. Consequences of dispersal in plants. pp. 203-236. *In: Rhodess O.E., Chesser R.K. and Smith M.H. eds. Population dynamics in ecological space and time.* University of Chicago Press, Chicago.
147. Nauenburg J.D. 1986. *Untersuchungen zur variabilität, ökologie und systematik der Viola tricolor-gruppe in Mitteleuropa.* Ph.D. thesis, University of Göttingen, Göttingen, Germany.
148. Nei M., Maruyama T. & Chakraborty R. 1975. The Bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*. **29**: 1-10.
149. Neuffer B., Auge H., Mesch H., Amarell U. & Brandl R. 1999. Spread of violets in polluted pine forests: Morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. *Molecular Ecology*. **8**: 365-377.
150. Nybom H. & Bartish I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. **3**: 93-114.
151. Ohkawara K. & Higashi S. 1994. Relative importance of ballistic and ant dispersal in two diplochorous *Viola* Species (Violaceae). *Oecologia*. **100**: 135-140.
152. Olivieri I. & Vitalis R. 2001. The biology of extinctions. *Medecine Sciences*. **17**: 63-69.
153. Oostermeijer J.G.B. 1989. Myrmecochory in *Polygala vulgaris* L., *Luzula campestris* (L.) DC. and *Viola curtisii* forster in a Dutch dune area. *Oecologia*. **78**: 302-311.
154. Oostermeijer J.G.B., Brugman M.L., De Boer E.R. & Den Nijs H.C.M. 1996. Temporal and spatial variation in the demography of *Gentiana pneumonanthe*, a rare perennial herb. *Journal of ecology*. **84**: 153-166.
155. Oostermeijer J.G.B., Luijten S.H., Klenova Z.V. & Den Nijs H.C.M. 1998. Relationship between population and habitat characteristics and reproduction of the rare *Gentiana pneumonanthe* L.. *Conservation Biology*. **12**: 1042-1053.
156. Oostermeijer J.G.B., Luijten S.H. & den Nijs J.C.M. 2003. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation*. **113**: 389-398.
157. Ouborg N. J. & Van Treuren R. 1995. Variation in fitness-related characters among small and large populations of *Salvia pratensis*. *Journal of Ecology*. **83**: 369-380.



158. Page R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. **12**: 357-358.
159. Pahaut P. 1988. Au sujet du Rocheux calaminaire. *Revue verviétoise d'histoire naturelle*. **Numéro spécial**: 11-14.
160. Paz-Gonzalez A., Castro M.T.T. & Vieira S.R. 2001. Geostatistical analysis of heavy metals in a one-hectare plot under natural vegetation in a serpentine area. *Canadian Journal of Soil Science*. **81**: 469-479.
161. Peterson A., Bartish IV & Peterson J. 2002. Genetic structure detected in a small population of the endangered plant *Anthericum liliago* (Anthericaceae) by Rapid Analysis. *Ecography*. **25**: 677-684.
162. Pimm S.L., Russell G.J., Gittleman J.L. & Brooks T.M. 1995. The future of biodiversity. *Science*. **269**: 347-350.
163. Pitman N.C.A. & Jorgensen P.M. 2002. Estimating the size of the world's threatened flora. *Science*. **298**: 989-989.
164. Pluess A.R. & Stocklin J. 2004a. Genetic diversity and fitness in *Scabiosa columbaria* in the Swiss Jura in relation to population size. *Conservation Genetics*. **52**: 145-156.
165. Pluess A.R. & Stocklin J. 2004b. Population genetic diversity of the clonal plant *Geum reptans* (Rosaceae) in the Swiss Alps. *American Journal of Botany*. **91**: 2013-2021.
166. Pollard J. & Baker A.J.M. 1997. Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytologist*. **135**: 655-658
167. Prentice H.C., Lönn M., Lager H., Rosen E. & Van Der Maarel E. 2000. Changes in allozyme frequencies in *Festuca ovina* populations after a 9-year nutrient/water experiment. *Journal of Ecology*. **88**: 331-347.
168. Price M.V. & Waser N.M. 1979. Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsonii*. *Nature*. **277**: 294-296.
169. Primack R.B. 1998. *Essentials of conservation biology*. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer, Sunderland.
170. Rabinowitz D. 1981. Seven forms of rarity. pp. 205-217. In: Synge H. ed. *The Biological Aspects of Rare Plant Conservation*. Wiley, Chichester.
171. Rathcke B.J. & Jules E.S. 1993. Habitat fragmentation and plant pollinator interactions. *Current science*. **65**: 273-277.
172. Reed D. H. & Frankham R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*. **171**: 230-237.
173. Reed D.H. 2005. Relationship between population size and fitness. *Conservation Biology*. **19**: 563-568

174. Reynolds J., Weir B.S. & Cockerham C.C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*. **105**: 767-779
175. Ridley M. 2004. *Evolution*. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
176. Robertson A., Newton A.C. & Ennos R.A. 2004. Multiple hybrid origins, genetic diversity and population genetic structure of two endemic *Sorbus* taxa on the Isle of Arran, Scotland. *Molecular Ecology*. **13**: 123-134.
177. Roll J., Mitchell R.J., Cabin R.J. & Marshall D.L. 1997. Reproductive success increases with local density of conspecifics in a desert Mustard (*Lesquerella fendleri*). *Conservation biology*. **11**: 738-746.
178. Rosenberg M. 2001. *PASSAGE: Pattern analysis, spatial statistics, and geographical exegesis*. Arizona State University, Tempe, Arizona.
179. Rostanski A. 2003. Taxonomic problems within the section *Melanium* Ging. of the genus *Viola* L. *International Journal of Invertebrate Taxonomy*. **Supplement**: 65-74.
180. Salemaa M., Vanha-Majamaa I. & Gardner P.J. 1999. Compensatory growth of two clonal dwarf shrubs, *Arctostaphylos uva-ursi* and *Vaccinium uliginosum* in a heavy metal polluted environment. *Plant Ecology*. **141**: 79-91.
181. Salemaa M. & Sievanen R. 2002. The effect of apical dominance on the branching architecture of *Arctostaphylos uva-ursi* in four contrasting environments. *Flora*. **197**: 429-442.
182. Sales E., Nebauer S.G., Mus M. & Segura J. 2001. Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* Scrophulariaceae using RAPD markers. *American Journal of Botany*. **88**: 1750-1759.
183. Schemske D.W. & Lande R. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution*. **39**: 41-52.
184. Schemske D.W., Husband B.C., Ruckelshaus M.H., Goodwillie C., Parker I. & Bishop J.G. 1994 Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology*. **75**: 584-606.
185. Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. 2000. *Arlequin ver 2.000: a software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
186. Shimono A., Ueno S., Tsumura Y. & Washitani I. 2006. Spatial genetic structure links between soil seed banks and above-ground populations of *Primula modesta* in subalpine grassland. *Journal of Ecology*. **94**: 77-86.

187. Sih A. & Baltus M.S. 1987. Patch size, pollinator behaviour, and pollinator limitation in CATNIP. *Ecology*. **68**: 1679-1690.
188. Sih A., Jonsson B.G. & Luikart G. 2000. Habitat loss: ecological, evolutionary and genetic consequences. *Trends in Ecology and Evolution*. **15**: 132-134.
189. Simon E. 1975. La dynamique de la végétation de quelques sites métallifères dans les régions d'Eupen et d'Aix-la-Chapelle en relation avec les facteurs édaphiques. *Bulletin de la Société Royale Botanique Belge*. **108**: 273-286.
190. Simon E. 1978. Heavy metals in soils, vegetation development and heavy metal tolerance in plant populations from metalliferous areas. *New Phytologist*. **81**: 175-188.
191. Simon E. 1979. *Etude écologique et génétique de la végétation des sites métallifères*. Ph.D. thesis, Université libre de Bruxelles, Belgique.
192. Siuta A., Bożek M., Jędrzejczyk M., Rostański A. & Kuta E. 2005. Is the Blue Zinc Violet *Viola guesstphalica* Nauenb. a Taxon of Hybrid Origin? Evidence from Embryology. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. **47**: 237-245.
193. Slatkin M. 1977. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent extinctions. *Theoretical Population Biology*. **12**: 253-262.
194. Smith F.D.M., May R.M., Pellew R., Johnson T.H. & Walter K.R. 1993. Estimating extinction rates. *Nature*. **494**: 494-496.
195. Smith J.F. & Pham T.V. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* Alliaceae. *American Journal of Botany*. **83**: 717-726.
196. Sokal R.R. 1979. Ecological parameters inferred from spatial correlograms. pp 167-196. In Patil G.P. & Rosenzweig M.L. eds. *Contemporary quantitative ecology and related ecometrics*. International Cooperative Publishing House, Fairland.
197. Soltis P.S. & Soltis D.E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**: 7051-7057.
198. Steffan-Dewenter I. & Tscharntke T. 1999. Effect of habitat isolation on pollinator communities and seed set. *Oecologia*. **212**: 432-440.
199. Stenstrom A., Jonsson B.O., Jonsdottir I.S., Fagerstrom T. & Augner M. 2001. Genetic variation and clonal diversity in four clonal sedges (*Carex*) along the Arctic coast of Eurasia. *Molecular Ecology*. **10**: 497-513.
200. Stephens P.A., Sutherland W.J. & Freckleton R.P. 1999. What is the Allee effect? *Oikos*. **87**:185-190.

201. Tague R.T. & Fore S.A. 2005. Analysis of the spatial genetic structure of *Passiflora incarnata* in recently disturbed sites. *Canadian Journal of Botany*. **83**: 420-426.
202. Temmerman de L.O., Hoenig M. & Scokart P.O. 1984. Determination of "normal" levels and upper limit values of trace elements in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. **147**: 687-694.
203. Ter Braak C.J.F. & Smilauer P. 2002. *CANOCO reference manual and CanoDraw for windows user's guide: software for canonical community ordination version 4.5*. Microcomputer Power, Ithaca.
204. Tero N., Aspi J., Siikamaki P. & Jakalaniemi A. 2005. Local genetic population structure in an endangered plant species, *Silene tatarica* (Caryophyllaceae). *Heredity*. **94**: 478-487.
205. Teyssède A. 2004. Vers une sixième grande crise d'extinctions. pp. 24-49. In: Barbault R. & Chevassus-au-Louis B. eds. *Biodiversité et changements globaux*. Ministère des affaires étrangères, association pour la diffusion de la pensée française, Paris.
206. Tonin C. 2001. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza*. **10**: 161-168.
207. Torres E., Iriondo J.M., Escudero A. & Perez C.. 2003a. Analysis of within-population spatial genetic structure in *Antirrhinum microphyllum* Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*. **90**: 1688-1695.
208. Torres E., Iriondo J.M. & Perez C. 2003b. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* Scrophulariaceae: Allozyme and RAPD analysis. *American Journal of Botany*. **90**: 85-92.
209. Travis S.E., Proffitt C.E. & Ritland K. 2004. Population structure and inbreeding vary with successional stage in created *Spartina alterniflora* marshes. *Ecological Applications*. **14**: 1189-1202.
210. Van Rossum F., Bonnin I., Fenart S., Pauwels M., Petit D. & Saumitou-Laprade P. 2004. Spatial genetic structure within a metallicolous population of *Arabidopsis halleri*, a clonal, self-incompatible and heavy-metal-tolerant species. *Molecular Ecology*. **13**: 2959-2967.
211. Vekemans X. & Lefèbvre C. 1997. On the evolution of heavy-metal tolerant populations in *Armeria maritima*: Evidence from allozyme variation and reproductive barriers. *Journal of Evolutionary Biology*. **10**: 175-191.

212. Vekemans X. & Hardy O.J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*. **13**: 921-935.
213. Wade M.J. & McCauley D.E. 1988. Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution*. **42**: 995-1005.
214. Walther-Hellwig K. & Frankl R. 2000. Foraging habitats and foraging distances of bumblebees, *Bombus* spp. (Hym., Apidae), in an agricultural landscape. *Journal of applied Entomology*. **124**: 299-306.
215. Warr S.J., Thompson K. & Kent M. 1993. Seed banks as a neglected area of biogeographic research: a review of literature and sampling techniques. *Progress in Physical Geography*. **173**: 329-347.
216. Watkinson A.R. & Powell J.C. 1993. Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant oopulations: a computer simulation of *Ranunculus repens*. *Journal of Ecology*. **81**: 707-717.
217. Westerbergh A. & Saura A. 1992. The effect of serpentine on the population structure of *Silene dioica* Caryophyllaceae. *Evolution*. **46**: 1537-1548.
218. Whiting S.N., Reeves R.D. & Baker A.J.M. 2002. Conserving biodiversity: mining, metallophytes and land reclamation. *Mining Environmental Management*. **10**: 11-16.
219. Whiting S.N., Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., Malaisse F., Paton A., Smith J.A.C., Angle J.S., Chaney R.L., Ginocchio R., Jaffre T., Johns R., McIntyre T., Purvis O.W., Salt D., Schat H., Zhao F.J. & Baker A.J.M. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restoration Ecology*. **12**: 106-116.
220. Willems J.H. 2004. Hoe is het eigenlijk met onze zinkflora gesteld? *Natuurhistorisch Maandblad*. **93**: 21-25.
221. Wolf A.T., Howe R.W. & Hamrick J.L. 2000. Genetic diversity and population structure of the serpentine endemic *Calystegia collina* Convolvulaceae in northern California. *American Journal of Botany*. **87**: 1138-1146.
222. Wolf A. 2001. Conservation of endemic plants in serpentine landscapes. *Biological Conservation*. **101**: 35-44.
223. Wolf A.T. & Harrison S.P. 2001. Effects of habitat size and patch isolation on reproductive success of serpentine morning glory. *Conservation Biology*. **15**: 111-121.
224. Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. **28**: 114-138.
225. Wu L. & Bradshaw A.D. 1972. Aerial pollution and the rapid evolution of copper tolerance. *Nature*. **238**: 167-169.

226. Young A., Boyle T. & Brown T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*. **11**: 413-418.
227. Young A.G., Hill J.H., Murray B.G. & Peakall R. 2002. Breeding system, genetic diversity and clonal structure in the sub-alpine forb *Rutidosia leiolepis* F. Muell. (Asteraceae). *Biological Conservation*. **106**: 71-78.
228. Zawko G., Krauss S., Dixon K.W. & Sivasithamparam K. 2001. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* Ericaceae. *Molecular Ecology*. **10**: 2389-2396.