

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

HYBRIDATION ET DYNAMIQUE DES POPULATIONS CHEZ LES RENOUEES DU
JAPON: ESPECES NON-INDIGENES INVASIVES DU GENRE *FALLOPIA* ADANS.
(POLYGONACEAE) EN BELGIQUE



Marie-Solange TIEBRE

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

Promoteur: G. Mahy
Année civile: 2007

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

HYBRIDATION ET DYNAMIQUE DES POPULATIONS CHEZ LES RENOUEES DU
JAPON: ESPECES NON-INDIGENES INVASIVES DU GENRE *FALLOPIA* ADANS.
(POLYGONACEAE) EN BELGIQUE

Marie-Solange TIEBRE

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

Promoteur: G. Mahy
Année civile: 2007

© Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et de des modifications ultérieures.

Tiébré Marie-Solange. (2007). Hybridation et dynamique des populations chez les renouées du Japon: Espèces non-indigènes invasives du genre *Fallopia* Adans. (Polygonaceae) en Belgique. Gembloux Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 164 p., 13 tabl., 21 fig.

Résumé

Les renouées du Japon sont des espèces clonales non-indigènes originaires d'Asie (Japon, Corée, Taiwan et Nord de la Chine). Elles ont été introduites en Europe au début du 19^e siècle. Elles font désormais partie des espèces non-indigènes les plus invasives en Europe et aux Etats Unis. En Belgique, elles sont représentées par un complexe de quatre taxons et un hybride. Tous ces taxons participent à la dynamique d'invasion et représentent un modèle d'intérêt pour les études de biologie des populations en Europe continentale occidentale. La présence d'au moins trois taxons et un hybride est confirmée par des études cytologiques, génétiques et morphologiques. La reproduction végétative est reconnue comme le principal mode de reproduction et d'expansion de ces taxons dans la zone d'introduction. Toutefois, des phénomènes d'hybridation interspécifique sont observés confirmant la restauration de la reproduction sexuée par hybridation au sein de ce complexe d'espèces en Belgique. L'hybride *F. x bohémica* avec différents niveaux de ploïdie, du tétraploïde à l'octoploïde, est observé. Un accroissement de la diversité génotypique et morphologique qui manquait aux espèces parents est démontré chez l'hybride *F. x bohémica*. Ceci pourrait augmenter le potentiel des renouées du Japon à s'adapter au nouvel environnement et contribuer au succès invasif de ces taxons en Belgique. Un test d'assignation indique un pool génétique différencié chez l'hybride *F. x bohémica* et non un mélange du pool génétique des espèces parentales comme attendu dans le cadre de taxons hybrides. L'hybride *F. x bohémica* a toujours été considéré comme rare en Belgique et d'origine horticole. Une analyse de la répartition spatiale montre que l'hybride *F. x bohémica* est très répandu en Belgique et que son abondance dépend des régions. Une analyse de l'étendue de la différenciation entre groupes d'individus hybrides géographiquement distants n'a pas pu fournir de preuve d'une évolution indépendante des populations hybrides sous un flux de gènes limité. Une analyse de la capacité de reproduction sexuée et de dispersion des graines démontre une production importante de graines viables et une pluie de graines conséquente. Les graines hybrides sont capables de se disperser à plus de 16m, laissant la possibilité de fonder de nouveaux individus et de contribuer au succès invasif de ces taxons. Cependant, une tendance à la diminution du potentiel de germination est observée après une période de froid chez ces taxons. Une analyse de la distribution à l'échelle du paysage a permis d'interpréter la dynamique de colonisation des taches d'habitats par les renouées du Japon comme relevant principalement de la propagation clonale malgré une pression de propagule importante. Les renouées du Japon préfèrent les habitats perturbés par l'homme avec une nette prédominance des réseaux linéaires de communications. Ceci laisse ensuite la possibilité de se disperser vers les taches d'habitats adjacents. Une dynamique d'établissement de propagules plus importante n'a pas été observée chez les plants hybrides comparées aux plants parents malgré l'accroissement de diversité génotypique et la pression de propagules considérable. Enfin, des pistes pour la gestion intégrée des renouées du Japon en Belgique sont proposées. Cette gestion devra en priorité identifier les hybrides et les taxons en présence. Des mesures d'émasculation et de gestion des clones existants pourraient constituer une solution pour empêcher la floraison et l'expansion de ces taxons. Une gestion active des habitats perturbés pourrait représenter une alternative pour prévenir l'invasion par les renouées du Japon.

Tiébré Marie-Solange. (2007). Hybridization and dynamics of populations of the Japanese knotweeds: Alien invasive species of the genus *Fallopia* (Polygonaceae) in Belgium. Thèse de doctorat. Gembloux, Belgium. Gembloux Agricultural University. 164 p., 13 tabl., 21 fig.

Abstract

The Japanese knotweeds are invasive alien clonal species originating in Asia (Japan, Korea, Taiwan and Nord of China). They were introduced in Europe at the beginning of the 19th century. They are now some of the most troublesome invasive alien species in Europe and in the United States. In Belgium, a complex of four taxa and a hybrid represents them. All these taxa take part in the pattern of invasion and represent an excellent opportunity for studies of population biology in Western continental Europe. The presence from at least three taxa and a hybrid is confirmed by cytological, genetic and morphological studies. Vegetative reproduction is recognized as the main mode of reproduction and expansion of these taxa in the introduce range. However, interspecific hybridization events are observed confirming the restoration of the sexual reproduction by hybridization within this complex species in Belgium. Hybrid *F. x bohemica* with various ploidy levels from tetraploid to octoploid is observed. An increase in genotypic and morphological diversity is shown at the hybrid *F. x bohemica* which missed with the parental species. This could increase the potential of Japanese knotweeds to adapt to the new environment and contribute to the invasive success of these taxa in Belgium. Assignment test indicates a genetic pool differentiated at the hybrid *F. x bohemica* and not a mixture of the genetic pool of the parental species as expected for hybrid taxa. Hybrid *F. x bohemica* has always been considered as rare in Belgium and of horticultural origin. An analysis of the spatial distribution shows that hybrid *F. x bohemica* is widespread in Belgium and that its abundance depends on the areas. An analysis of extent of differentiation between groups of hybrid geographically distant could not provide proof of an independent evolution of hybrid populations under limited gene flow. An analysis of the sexual reproduction capacity and dispersal of seeds shows important production of viable seeds and consequent seed rain. Hybrid seeds may be dispersed beyond 16m, leading the possibility of founding new individuals and to contribute to the invasive success of these taxa. However, a trend towards decreasing germination rate is shown after a cold period. An analysis of the distribution at the landscape scale shows that the dynamics of colonization of habitats patches by Japanese knotweeds rising mainly from clonal propagation in spite of important pressure of propagule. The knotweeds prefer human disturbed habitats with a clear prevalence of communication routes. This leads the possibility of dispersing towards the adjacent habitats patches. A high dynamics of establishment of propagule was not observed at the hybrid plants compared with the parents plants in spite of the increase in genotypic diversity and the consequent pressure of propagule. Lastly, proposals for the integrated management of these taxa are proposed in the Belgium context. Their management will have first to identify hybrids and taxa involved. Emasculation and management of the existing clones represent solutions to prevent flowering and expansion of these taxa. An active management of disturbed habitats may represent alternative to prevent the invasion by Japanese knotweeds.

Remerciements

Une thèse est l'aboutissement de plusieurs années de travail. Avant tout propos, je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué au bon déroulement de ces travaux.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Grégory Mahy pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir ainsi permis de réaliser cette thèse. Je le remercie pour sa disponibilité et sa guidance scientifique. Merci Grégory.

Je tiens aussi à remercier le Professeur François Malaisse pour m'avoir permis de m'inscrire à la Faculté de Gembloux.

Merci au Professeur Pierre Meerts et au Docteur John Paul Bailey pour voir relu certains chapitres de la thèse et pour toutes les suggestions d'amélioration. Mes remerciements vont aussi au Docteur Olivier Hardy pour sa disponibilité et son aide pour les analyses cytologiques et génétiques.

Un merci particulier à Jean-Philippe Bizoux pour la disponibilité et l'aide pour les analyses génétiques, Sonia Vanderhoeven pour ma première publication, Béatrice Lagrange pour l'aide sur le terrain et les « fous-rires », Guy Buchet pour la disponibilité et les centaines de pièges à graines, Layla Saad et Manu Bisteau pour les échanges « fructueux » et les « bavardages » entre filles.

Mes remerciements vont également à l'endroit de mes responsables de l'Université de Cocody à Abidjan-Côte d'Ivoire, le docteur Aman kadio Georges, le docteur N'Guessan Kouakou Edouard, le professeur Tano Yao Serges, le docteur Jeanne Zoundjihékon. Merci de m'avoir encouragée à entreprendre ces travaux de thèse.

A mes amis africains et européens: Mimi, Marie-ange, Michel, Sylvie, Alain, Niamba, Ben, Anastasie, Stan, Assamoi, Danie, Alice, Bilé, Gwladys, Guy-Alain, Audrey, Ray, Chantou, Anne-Christine, Manu, Akparo, Sonan, Zagbaï, Augustin, Evelyne, Daouda, Poupou, Kiss, Korami, Adou, Julien, Kass, Maman africa, Lily, Rébecca, Jean-Marc. C'est avec votre soutien que ces années d'étude se sont déroulées dans de bonnes conditions. Je tiens à vous remercier du fond du cœur pour les bons moments passés ensemble. À la rejoyure !

A toute l'équipe du Labo d'Ecologie, Nora, Manu d, Manu b, Emile, Marie, Sara, Arnaud, Julien P, Jean-Philippe, Sonia, Layla, les plus anciens, Anne-Christine, Guy-Alain, mais aussi les nouveaux, Julie, Ingrid, Marie-Sophie, Julien T, Bruno. Merci pour les bons moments passés ensemble et pour la bonne humeur.

Merci aussi à l'équipe de la Géopédologie, Roland, Gilles, Pierre-Yves, Nathalie, Joseph, Béatrice, Dominique, Bilo, Guy, Françoise et celle d'Aménagement des Territoires, Emilie, Anne, pour les bons moments passés ensemble et les pauses-café Délicieuses, hein Roland !

Je n'oublie pas l'équipe de Planète femmes et l'asbl Maison internationale, Michelle Moreau, Françoise et Thierry Henckaerts, Anne Willocq et Françoise Gourdien du service des études, l'association des étudiants ivoiriens en Belgique (ASETIB), les responsables de l'Ambassade de Côte d'Ivoire près le Benelux. Merci pour ce que vous faites dans le cadre de l'accueil et la guidance des étudiants. Merci pour la bonne humeur, la disponibilité et les conseils.

Enfin merci à ma famille, ma maman et mon papa pour la confiance, les encouragements, les conseils, à mes frères et mes sœurs, Nina, Carine, Miki, Léontine pour le soutien sans faille et les encouragements. Je n'oublie pas mon père, ma belle-mère, mes frères et sœurs, Clarisse, Gilles, Claudia, Olivier, Caroline. Merci pour votre soutien et vos encouragements. A ma troisième famille, belge cette fois, je dis merci à Maman, Coralie, Etienne. Merci pour le soutien, les encouragements et les discussions « d'avenir » et de « devenir », hein Etienne !

A toi, Raph, merci d'être toujours présent à mes côtés.

Table des matières

<i>Chapitre 1: Introduction générale</i>	0
1.1. Les espèces invasives et la biologie des invasions	0
1.2. Qu'est ce qu'une espèce non-indigène invasive? : Concepts et définitions	3
1.3. Le Cadre d'investigation	9
1.3.1. La génétique et la biologie évolutive	9
1.3.2. La biologie de la reproduction	12
1.3.3. L'écologie du paysage	13
1.4. Le modèle d'étude	14
1.4.1. Les renouées du Japon s.l.	14
1.4.2. Distribution géographique, habitats et mesures de gestion	15
1.4.3. Description	20
1.4.3. Les renouées du Japon en Belgique	25
1.5. Conclusion	30
1.6. Objectifs et organisation de la dissertation	30
Annexe	32
<i>Chapter 2: Hybridization and morphogenetic variation in the invasive alien Fallopia (Polygonaceae) complex in Belgium (western Europe)</i>	34
2.1. Introduction	36
2.2. Materials and methods	39
2.2.1. Materials	39
2.2.2. Determination of the ploidy level	43
2.2.3. RAPD analysis	43
2.2.4. Morphometric analysis	44
2.2.5. Statistical analysis	46
2.3. Results	47
2.3.1. Ploidy levels	47
2.3.2. RAPD variation	48
2.3.3. Morphological variation	53
2.4. Discussion	55
2.4.1. Hybridization pattern and genetic variation	55
2.4.2. Morphological characters for distinguishing all taxa of the alien Fallopia complex	62
2.5. Conclusions	63
Annexes	65
<i>Chapter 3: Hybridization and sexual reproduction in the invasive alien Fallopia Adans. (Polygonaceae) complex in Belgium</i>	70
3.1. Introduction	72
3.2. Materials and methods	75
3.2.1. Floral structure	75
3.2.2. Study area	75
3.2.3. Floral biology	76

3.2.4. Pollination and reproductive success	77
3.2.5. Seed rain and seed bank	77
3.2.6. Seed viability	78
3.2.7. Seed germination	79
3.2.8. Cytology	80
3.2.9. Flow cytometry	80
3.2.10. Seed dispersal	81
3.2.11. Statistical analyses	82
3.3. Results	83
3.3.1. Floral biology	83
3.3.2. Seed rain and seed bank	85
3.3.3. Seed germination and viability	85
3.3.4. Cytology	87
3.3.5. Flow cytometry	89
3.3.6. Seed dispersal	90
3.4. Discussion	91
3.4.1. Extensive sexual reproduction by hybridization	91
3.4.2. The fate of seeds produced by <i>F. japonica</i>	94
3.5. Conclusion	96
Annexes	98

Chapter 4: Landscape scale distribution and habitat selection by invasive alien species *Fallopia (Polygonaceae) complex in Belgium*

4.1. Introduction	106
4.2. Materials and methods	109
4.2.1. Study area and population survey	109
4.2.2. Habitat assessment	111
4.2.3. Habitat selection	111
4.2.4. Dynamics of <i>Fallopia</i> populations	112
4.3. Results	113
4.3.1. Habitat selection	113
4.3.2. Dynamics of <i>Fallopia</i> populations	119
4.4. Discussion	121
4.5. Conclusions	124
Annexes	125

Chapitre 5: Discussion générale

5.1. L'hybridation et les conséquences évolutives	130
5.2. L'hybridation et la contribution au succès invasif	141
5.3. Implications et pistes de réflexion pour les priorités de gestion et les mesures préventives	147
5.4. Conclusions et perspectives	150

Bibliographie

152

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1. Les espèces invasives et la biologie des invasions

L'invasion par les espèces non-indigènes est considérée comme une composante importante du changement global (Vitousek et al. 1997, Wilcove 1998, Mack et al. 2000, Gurevitch and Padilla 2004, Didham et al. 2005). Les espèces invasives sont reconnues comme des agents d'altération des processus écosystémiques tels que la productivité primaire, les cycles biogéochimiques et les régimes de perturbation (Vitousek et al. 1997). Leurs impacts sur la diversité biologique ont été démontrés maintes fois (Tableau 1.1). Des études ont mis en évidence l'impact écologique causé par ces espèces sur les espèces indigènes et les communautés (Wilcove 1998, Mack et al. 2000, Didham et al. 2005). L'invasion par les espèces non-indigènes contribue à l'homogénéisation des biomes, à la prolifération des espèces opportunistes et à un accroissement du taux des espèces qui prospèrent dans les milieux perturbés par l'homme. De plus, il a été montré que les invasions biologiques interagissent avec les autres composantes majeures du changement global comme la détérioration des habitats et les changements dans l'utilisation du sol (D'Antonio and Vitousek 1992, Vitousek et al. 1997). Ces impacts sont appelés à être de plus en plus sévères, touchant à tous les écosystèmes, compte tenu du nombre croissant d'espèces non-indigènes qui s'établissent et se répandent dans de nouvelles localités à travers le monde. Aux Etats Unis, par exemple, une étude récente a estimé à pas moins de 50000 les espèces non-indigènes établies (Pimentel et al. 2000).

En plus des dommages écologiques, l'impact économique causé par ces espèces est important à l'échelle mondiale. Pimentel et al. (2000) ont estimé à environ 137 milliards de dollars par

an les pertes économiques causées par ces espèces aux Etats Unis. Des études ont aussi montré que les espèces introduites peuvent être des vecteurs de maladies humaines (Craven et al. 1988).

Tableau 1.1 Nombres d'espèces affectées par les différentes menaces responsables du déclin de la biodiversité (Gurevitch and Padilla 2004). Ce tableau provient d'une ré-analyse des données de Wilcove (1998) sur 930 espèces qui ont été rapportées comme menacées. Les catégories ne sont pas exclusives et les nombres ne sont pas des sommes des nombres totaux d'espèces. Selon cette analyse, l'invasion par les plantes non-indigènes constitue la 2^{ème} cause de perte de la diversité biologique après la destruction et la fragmentation des habitats par l'homme.

Causes du déclin	Toutes espèces (930)	Plantes (602)	Oiseaux (68)
Destruction et fragmentation des habitats	497	233	48
Exploitation (chasse, pêche, collection) et piégeage	90	19	11
Feux et changements dans les régime des feux	102	92	1
Pollution (herbicides, pesticides, déversements d'huiles, etc.)	32	4	5
Prédateurs non-indigènes invasifs et herbivores	131	73	39
Plantes non-indigènes: compétition et effets indirect de l'habitat	431	410	19
Compétition avec les animaux non-indigènes (exception animaux domestiques et sauvages)	67	0	14
Cochons sauvages (herbivorie, prédation, compétition et/ou effets de l'habitat)	268	257	8
Pâturage, et/ou piétinement par le bétail domestique ou sauvage, les chèvres, etc.	327	295	13
Hybridation avec les espèces non-indigènes	22	5	0
Maladies (incluant les espèces non-indigènes et natives)	33	3	23
Parasites (physiologique et comportement)	3	0	2
Autres causes ou non connues	169	134	8

Face à ces problèmes la prévention, la gestion, et le contrôle des espèces invasives, sont devenus des enjeux majeurs auxquels les gestionnaires, les biologistes de la conservation et les biologistes de la restauration doivent faire face (Allendorf and Lundquist 2003). La gestion et la surveillance des populations d'espèces invasives demande à disposer de données, biologique, écologique, génétique et biogéographique afin d'identifier les espèces susceptibles d'être invasives, de prévoir le potentiel des espèces invasives à réagir aux pratiques de gestion et de mettre en place des mesures de prévention (Rejmánek 1995, Allendorf and Lundquist 2003, Simberloff 2003). La contribution potentielle de la recherche

fondamentale dans l'étude des invasions biologiques et notamment de la biologie des populations des espèces invasives est de plus en plus reconnue (Sakai et al. 2001, Allendorf and Lundquist 2003, Simberloff 2003).

Les études de biologie des populations peuvent fournir des données clés pour lutter contre les invasions biologiques à travers une meilleure compréhension des mécanismes écologiques et des processus génétiques qui favorisent les invasions et leurs impacts sur les espèces, les communautés et les écosystèmes indigènes (Silvertown and Charlesworth 2001). Cette discipline propose d'étudier les traits d'histoire de vie, les stratégies démographiques, la structure génétique et l'évolution des espèces aussi bien dans l'aire d'introduction que dans l'aire d'origine (Sakai et al. 2001, Allendorf and Lundquist 2003).

L'étude des traits d'histoire de vie peut permettre de prédire les types d'espèces non-indigènes susceptibles d'avoir des impacts significatifs, d'identifier les stades de vie critiques pendant lesquels le contrôle est plus efficace ou d'identifier la faisabilité d'une stratégie d'éradication comparée à un contrôle de l'extension de ces espèces. Les études de diversité génétique et du potentiel évolutif des espèces invasives fournissent des informations utiles sur les causes génétiques qui sous-tendent les invasions, la dynamique de colonisation et d'expansion. Les modèles démographiques ainsi que la modélisation spatiale des populations sont utilisés pour examiner et prédire l'expansion des espèces invasives et pour définir ou adapter les méthodes de contrôle et/ou de gestion (Sakai et al. 2001, Allendorf and Lundquist 2003).

1.2. Qu'est ce qu'un taxon non-indigène invasif ? : Concepts et définitions

Différentes définitions des taxons non-indigènes invasifs ont été suggérées mais dans la plupart des cas, ces définitions ne sont pas complètes ou si elles le sont, elles ne sont pas élaborées de manière consistante (Davis and Thompson 2000). De nombreux essais de clarification de la terminologie des taxons invasifs ont été proposés (Williamson and Fitter 1996, Davis and Thompson 2000, IUCN 2000, Richardson et al. 2000, Falk-Petersen et al. 2006, Pyšek and Richardson 2006). Selon l'auteur, un taxon sera désigné comme 'immigrant' (Bazzaz 1986), 'indigenous' (Sauer 1988), 'nonindigenous' (Pimentel et al. 2000), 'weedy' (Fox 1990), 'naturalized' (Hussey et al. 1992), 'alien' (Crawley et al. 1996), 'imported' (Williamson and Fitter 1996), 'colonizer' (Williamson 1996, Davis and Thompson 2000, Richardson et al. 2000), 'native' (Meyer and Florence 1996, Pimentel et al. 2000), 'non-native' (Davis et al. 2000), 'endemic' (Williamson 1996), 'exotic' (Green 1997), invasive (Daehler 1998, Davis and Thompson 2000), 'introduced' (Lonsdale 1999). Dans le cadre de cette étude, la définition adoptée est celle de Pyšek et Richardson (2006). Le facteur déterminant pour distinguer un taxon non-indigène d'un taxon indigène est de considérer si la présence de ce taxon dans une région donnée est liée à l'activité humaine. Cette définition exclut les taxons qui envahissent une région suite à une colonisation naturelle (exemple des colonisations postglaciaires). Ce type de colonisation est souvent désigné sous les termes de migration, expansion ou extension d'habitat. Cette définition exclut également les taxons qui accroissent leur distribution en colonisant de nouveaux habitats disponibles dans leur aire de distribution indigène.

En suivant cette approche, un taxon indigène est un taxon qui est originaire d'une région donnée sans l'intervention accidentelle ou intentionnelle de l'homme. Un taxon non-indigène

(syn. exotique, adventif, étranger, nouveau, introduit) (Falk-Petersen et al. 2006) est un taxon qui occupe un territoire géographique donné et dont la présence est due à une introduction accidentelle ou intentionnelle de l'homme. Un taxon naturalisé est un taxon non-indigène qui se reproduit de façon consistante et maintient sa population à travers plusieurs cycles de vie sans l'intervention directe de l'homme. Il se reproduit et génère des descendants de façon sexuée ou végétative, souvent à proximité des plantes adultes et n'envahit pas nécessairement les écosystèmes naturels ou semi-naturels d'origine anthropique. Un taxon invasif est un taxon naturalisé qui génère des descendants, souvent en très grand nombre, s'installant à des distances considérables des plantes adultes et possédant de ce fait un potentiel de dispersion qui lui permet d'étendre son aire géographique (Richardson et al. 2000, Pyšek and Richardson 2006).

Ainsi, deux critères permettent de définir le processus de l'invasion : le critère de participation humaine et le critère d'accroissement de l'aire géographique dans le nouvel environnement. Le succès reproductif étant un pré-requis pour toute invasion réussie.

Il faut aussi noter que certains auteurs prennent en compte la notion d'impact dans la définition des taxons non-indigènes invasifs (Davis and Thompson 2000, IUCN 2000). Pour ces auteurs, un taxon non-indigène invasif est un taxon naturalisé qui est un agent de changement et qui menace la biodiversité indigène. Dans le cadre de cette étude, la notion d'impact n'a pas été retenue à dessein car c'est un critère subjectif qui dépend souvent des valeurs individuelles. De plus, selon Daehler (2001) et Starfinger et al. (2003), l'évaluation des conséquences négatives qu'elles soient sociales ou économiques est toujours considérée par rapport à un objectif d'étude et une échelle donnée. En outre, Mooney et Hobbs (2000) ont montré que les espèces introduites n'ont pas toujours des impacts significatifs sur les écosystèmes de l'aire d'introduction. En conséquence, la prise en compte de la notion d'impact dans l'étude sur les espèces invasives a amené à l'utilisation des termes comme

‘pest’, ‘weed’, ‘harmful species’, ‘problem plants’ ou ‘biological pollutants’ (Falk-Petersen et al. 2006). Un taxon nuisible est donc un taxon invasif qui a des impacts négatifs directs ou indirects sur l’homme et qui est perçu comme un taxon indésirable en terme d’économie, de santé publique ou d’environnement. Cette définition de taxon nuisible a plus une base socio-économique qu’écologique et n’a donc pas été retenue dans le cadre de cette étude.

L’invasion biologique se produit lorsqu’un taxon non-indigène a franchi une succession de barrières biotiques et abiotiques (Figure 1.1).

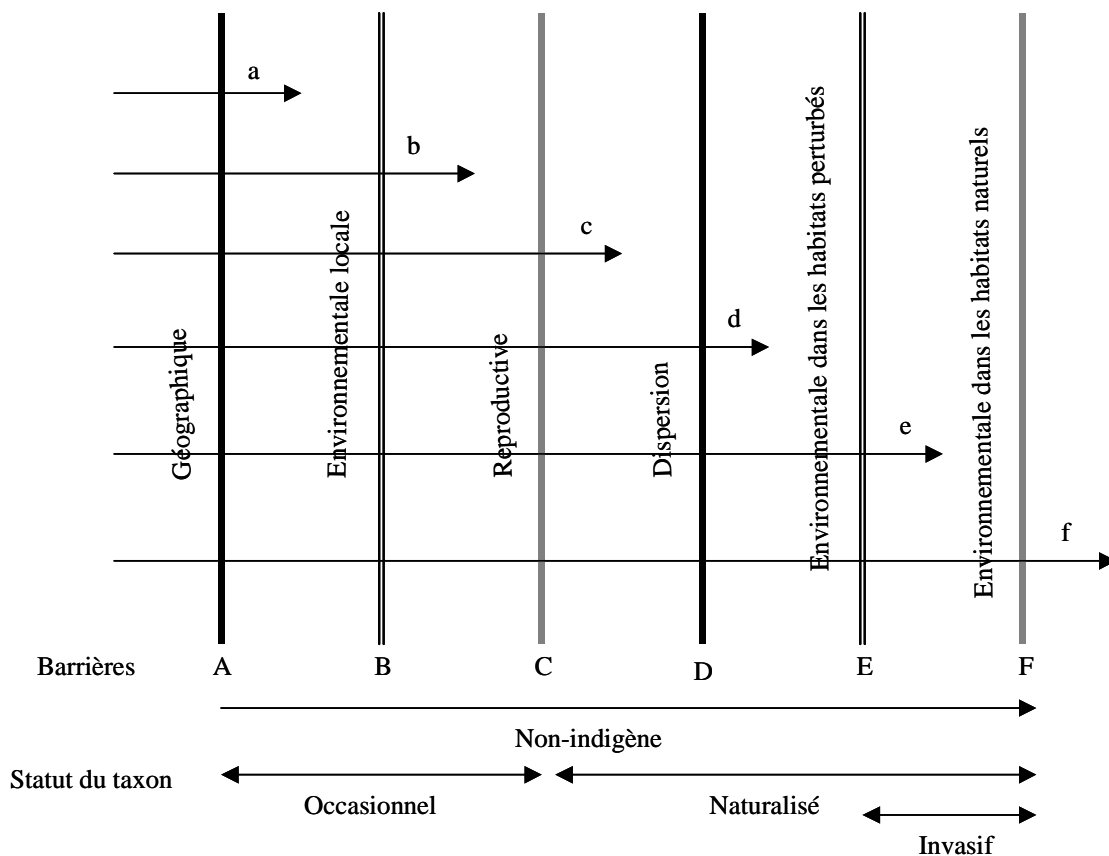


Fig. 1.1 Représentation schématique des barrières majeures qui limitent la dispersion des plantes non-indigènes (Richardson et al. 2000).

Ces barrières sont: (A) les barrières géographiques (intercontinentales ou intracontinentales) sur une échelle approximative supérieure à des centaines de kilomètres; (B) les barrières

environnementales (biotiques et abiotiques) dans l'aire d'introduction; (C) les barrières à la reproduction (la prévention contre la production consistante et à long terme de descendants végétatifs ou sexués); (D) les barrières locales/régionales à la dispersion; (E) les barrières environnementales dans les habitats perturbés par l'homme; et (F) les barrières environnementales dans les habitats naturels ou semi-naturels (Richardson et al. 2000, Kolar and Lodge 2001).

De nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer le fait qu'une proportion des espèces non-indigènes devienne envahissante dans leur aire d'introduction. Parmi ces hypothèses, on peut en retenir trois le plus souvent citées dans la littérature. La première hypothèse est la présence de traits d'histoire de vie qui prédisposent les espèces à une expansion rapide. Baker (1965) a discuté des traits qui peuvent être associés aux plantes invasives. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer la combinaison de la reproduction sexuée et asexuée, la croissance rapide du stade juvénile à l'âge adulte, l'adaptation au stress environnemental et la plasticité phénotypique. Pyšek et al. (1995) ont montré que le succès invasif d'une espèce végétale non-indigène peut être corrélé à la taille de la plante, la forme de vie et l'aptitude compétitive. Daehler (1998) a montré pour sa part que le succès invasif des espèces non-indigènes peut être lié à la reproduction végétative, à l'absence de besoins en levée de dormance pour la germination des graines et à un caractère hermaphrodite. Bien que ce concept de « ideal weed » soit souvent cité à travers la littérature (Baker 1974, Newsome and Noble 1986, Williamson and Fitter 1996, Gaskin and Schaal 2002), très peu d'études empiriques permettent d'étayer cette hypothèse (Kolar and Lodge 2001). Nous pouvons citer néanmoins les travaux de Rejmánek et Richardson (1996) sur les traits des espèces du genre *Pinus* qui favorisent leur invasion. Selon ces auteurs, la combinaison des trois variables (petite masse des graines, courte période juvénile et court interval entre la production de

graines de grande taille) permet de prédire le succès invasif chez le genre *Pinus*. Nous pouvons aussi citer les travaux de Vilà et Weiner (2004) sur la supériorité compétitive des espèces non-indigènes invasives. De leur revue de la littérature, ces auteurs ont montré que l'effet des espèces non-indigènes invasives sur les espèces indigènes est souvent plus important que l'effet des espèces indigènes sur les espèces non-indigènes invasives. Toutefois ces deux auteurs ont démontré que dans la plupart des travaux, la sélection des espèces non-indigènes invasives et indigènes ne s'est pas faite au hasard et est souvent biaisée vers le choix d'espèces très hautement compétitives, alors que ces espèces sont représentées en faible fréquence comparée à la moyenne des espèces compétitrices. Nous pouvons aussi citer les récents travaux de Richards et al. (2006) sur le lien entre la plasticité phénotypique et le succès d'invasion. De leur revue de littérature, ces auteurs ont démontré que les espèces non-indigènes invasives présentent une plus grande plasticité en ce qui concerne les traits qui affectent la fitness comparées aux espèces indigènes ou non-indigènes non-invasives. Ces auteurs ont aussi mis en évidence le fait que la plupart de travaux publiés étaient biaisés en faveur de ceux qui montrent une grande plasticité et aucune étude ne rapportent le contraire.

La seconde hypothèse est l'absence d'ennemis naturels dans la zone d'introduction (ERH: enemy release hypothesis) (Maron and Vilà 2001, Keane and Crawley 2002). Cette hypothèse stipule que la capacité des plantes invasives à proliférer est due à la perte des compétiteurs d'origine, des herbivores spécialistes et des pathogènes lors de l'introduction. Une hypothèse additionnelle est l'évolution d'une capacité compétitive accrue (EICA: evolution of increased competitive ability) (Blossey and Nötzold 1995). Blossey et Nötzold (1995) proposent que les plantes introduites libérées des ennemis naturels perdent les moyens de défense coûteux contre l'herbivorie et réallouent ces ressources préalablement dépensées à la défense à des traits qui renforcent la capacité compétitive comme l'accroissement de la taille ou la fécondité. L'hypothèse EICA prédit que les plantes introduites doivent être plus grandes ou

plus fécondes que leurs congénères d'origine. Les tests sur l'hypothèse de l'évolution de la capacité compétitive accrue n'ont pas été très concluants (Willis et al. 2000, Thébaud and Simberloff 2001, Leger and Rice 2003, Maron et al. 2004, Bossdorf et al. 2005) et certains auteurs ont montré que le patron général d'accroissement de la vigueur des plantes invasives pourrait simplement résulter d'un échantillonnage biaisé du potentiel des invasives en faveur des traits qui montrent un accroissement de la vigueur dans la zone d'introduction (Simons 2003).

Un troisième ensemble d'hypothèses se rapporte aux processus évolutifs se déroulant lors de l'invasion biologique (Abbott 1992). L'évolution chez les espèces non-indigènes est maintenant reconnue comme un processus majeur en biologie de l'invasion (Baker 1974, Lee 2002, Maron et al. 2004). Les espèces non-indigènes introduites dans un nouvel environnement peuvent évoluer rapidement et des changements génétiques rapides peuvent intervenir avec des conséquences phénotypiques importantes (Lee 2002, Maron et al. 2004, Bossdorf et al. 2005). Les changements évolutifs peuvent s'opérer pour différentes raisons: ils peuvent résulter de l'évolution par dérive génétique et consanguinité des espèces fondatrices (Brown and Marshall 1981, Barrett and Husband 1990), de l'hybridation inter ou intraspécifique qui créent de nouveaux génotypes ayant un meilleur fitness dans les habitats envahis (Ellstrand and Schierenbeck 2000, Hails and Morley 2005, Mallet 2005, Bleeker et al. 2007) ou de changements drastiques dans les régimes de sélection qui créent des changements évolutifs adaptatifs (Mooney and Cleland 2001, Sakai et al. 2001). De plus, il a été montré que les deux hypothèses précitées (ERH et EICA) peuvent être modifiées par l'évolution des espèces dans l'aire d'introduction. Les nouveaux génotypes formés peuvent ainsi être capables de dissuader les pathogènes et les herbivores aussi bien et souvent mieux que les génotypes parentaux (Gaskin and Schaal 2002). En conséquence, les aspects évolutifs du

phénomène de l'invasion biologique sont également à prendre en compte lors de l'étude des facteurs qui confèrent le succès invasif.

1.3. Le Cadre d'investigation

1.3.1. La génétique et la biologie évolutive

Les études sur les espèces invasives font souvent référence à des changements évolutifs rapides dans la zone d'introduction (Abbott 1992, Vilà et al. 2000, Lee 2002). Les espèces exotiques constituent donc un excellent modèle pour étudier des phénomènes d'évolution en biologie des populations car les effets de fondation, l'hybridation intra et/ou interspécifique et l'adaptation au nouvel environnement induisent la plupart du temps des différenciations génétiques entre les populations d'origine et les populations introduites et peuvent parfois contribuer au succès de certaines espèces (Bossdorf et al. 2005). De plus, si des changements évolutifs existent, une connaissance de la vitesse et de la direction dans laquelle ils se produisent peut aider à améliorer les prévisions sur l'efficacité des mesures de contrôle et de gestion (Müller-Schärer et al. 2004).

Il a souvent été démontré que le potentiel d'adaptation dépend de la quantité de diversité génétique introduite (Brown and Marshall 1981, Barrett and Husband 1990). Toutefois, l'hybridation interspécifique est maintenant reconnue comme un mécanisme majeur d'évolution chez les plantes invasives (Abbott 1992). L'hybridation interspécifique, couplée à la polyploidie, permet aux espèces de diversifier leur génome par des réarrangements génomiques, leur conférant une plasticité adaptative (Richards et al. 2006). Elle permet aussi aux espèces d'augmenter leur taux d'hétérozygotie et de réduire l'incidence de la consanguinité (Sakai et al. 2001, Soltis et al. 2003, Hegarty and Hiscock 2005). Ce type

d'hybridation peut conduire à des altérations génotypiques, résultant en un accroissement de la diversité génétique (Bretagnolle et al. 1998, Soltis and Soltis 2000, Wendel 2000, Liu and Wendel 2003, Doyle et al. 2004, Soltis et al. 2004). Ces altérations génotypiques et génomiques peuvent stimuler la capacité d'invasion des nouveaux taxons formés en induisant une évolution rapide (Ellstrand and Schierenbeck 2000, Grosholz 2002, Allendorf and Lundquist 2003, Müller-Schärer et al. 2004). Les nouveaux génotypes formés vont servir de matériel pour la sélection naturelle qui va garder les phénotypes les plus adaptés aux niches écologiques rencontrées dans l'aire d'introduction (Hails and Morley 2005).

Toutefois, l'identification des hybrides sur la base morphologique n'est pas toujours aisée car le polymorphisme ainsi que les mutations peuvent intervenir sur un tout petit nombre de gènes qui ne sont pas toujours apparent chez les hybrides (Petit 2004, Hegarty and Hiscock 2005, Lopez et al. 2005). L'analyse par les marqueurs moléculaires constitue de ce fait un outil plus rigoureux pour étudier l'hybridation et l'introgession en biologie de l'invasion (Mallet 2005, Engel et al. 2006). De plus, de nombreuses études ont montré que l'analyse par les marqueurs moléculaires, couplée à la morphométrie, permet de tester rigoureusement les patrons d'hybridation et d'introgession et peut être un outil performant pour différencier les taxons dans des populations complexes (Fjellheim et al. 2001, Persson and Gustavsson 2001, Hänfling and Kollmann 2002, Cattell and Karl 2004, Petit 2004, Bossdorf et al. 2005, Paun et al. 2006).

Les méthodes génétiques traditionnellement utilisées pour étudier l'hybridation et l'origine des plantes invasives sont les allozymes (Ellstrand and Roose 1987, Widén et al. 1994, Soltis et al. 1995, Abbott 2000, Pfennig 2003), les RAPDs (random amplified polymorphic DNA) (Gabrielsen and Brochmann 1998, Fjellheim et al. 2001, Arafeh et al. 2002) et les AFLPs (amplified fragment length polymorphism) (O'Hanlon et al. 1999, Maron et al. 2004, Paun et al. 2006). L'avantage de ces méthodes réside dans leur capacité à traiter un très grand nombre

d'échantillons et leur potentiel élevé pour trouver de la variation génétique (sauf dans le cas des allozymes). D'autres méthodes comme les SSR (simple sequence repeat) permettent aussi d'identifier et de déterminer l'origine des plantes invasives, mais contrairement à celles précitées, elles ont été très peu utilisées à cause du manque de marqueurs mis au point et du coût élevé pour le traitement des échantillons (Vekemans and Jacquemart 1997, Cotrim et al. 2003). De plus, ces marqueurs séquentiels représentent seulement une petite partie du génome et les individus doivent être désignés sur la base de ces régions. Toutefois, avec l'avènement de marqueurs séquentiels ayant une plus grande résolution, de plus en plus de recherches s'orientent vers l'utilisation des marqueurs de séquence pour étudier l'identité et l'origine des plantes invasives (Gaskin and Schaal 2002, Poulin et al. 2005, Dong et al. 2006, Paun et al. 2006).

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi la méthode RAPD (random amplified polymorphic DNA). Cette méthode permet d'analyser l'ADN en utilisant la technique PCR (Polymerase chain reaction) et des marqueurs de petites tailles (10bp) choisis arbitrairement et qui amplifient l'ADN génomique de manière aléatoire. Au cours des dernières années cette méthode a été utilisée avec succès pour étudier la variation génétique et la différenciation intra et interspécifique (Esselman et al. 1999, Hansen et al. 2000, Persson and Gustavsson 2001, Hangelbroek et al. 2002, Rout et al. 2003, Torimaru et al. 2003, Artyukova et al. 2004). Malgré l'existence de certaines limitations (marqueur dominant, problème de répétitivité et sensibilité aux conditions de réaction) dont certaines peuvent être surmontées si les procédures expérimentales et la sélection de marqueurs sont réalisées de façon rigoureuse, l'analyse RAPD présente l'avantage de détecter du polymorphisme dans l'entièreté du génome et de fournir un nombre conséquent de marqueurs, condition essentielle pour élucider les relations entre les populations et les taxons de plantes.

1.3.2. La biologie de la reproduction

Comme la plupart des plantes vasculaires, les espèces invasives peuvent présenter une combinaison de reproduction par voie sexuée et/ou par voie végétative. Les avantages de la reproduction végétative sont une propagation rapide et quasi illimitée des gènes favorables, une possibilité pour les génomes stériles de se multiplier, un potentiel de colonisation rapide des habitats favorables, une durée de vie potentiellement illimitée et une répartition des risques d'extinction des clones (Silander 1985). La reproduction sexuée présente l'avantage de produire des graines et de générer de la variabilité génétique, augmentant ainsi le potentiel d'évolution et d'adaptation des espèces. En outre en se dispersant, les graines peuvent fonder de nouvelles populations, échappant ainsi à la sénescence, aux pathogènes et aux effets délétères des mutations somatiques (Silander 1985).

Lors de l'étude des traits d'histoire de vie des espèces qui favorisent les invasions, différents auteurs ont montré qu'un mode de reproduction sexuée et/ou asexuée, une croissance rapide, une absence de besoins en levée de dormance pour la germination des graines et des fleurs parfaitement hermaphrodites constituaient des traits reproductifs pouvant permettre d'expliquer le succès invasif (Baker 1974, Rejmánek 1995, Crawley et al. 1996).

Aussi, l'étude des processus de recrutement incluant la production de graines, la dispersion spatiale et temporelle, la germination, l'établissement et la survie des plantules, la reproduction végétative est essentielle pour déterminer de façon précise les caractéristiques des espèces qui favorisent l'invasion, de mieux comprendre les mécanismes et la dynamique d'invasion afin de déterminer les actions préventives à mettre en œuvre pour stopper ou freiner ces invasions (Daehler and Strong 1994, Vilà et al. 2000, Grotkopp et al. 2002).

1.3.3. L'écologie du paysage

Analyser la distribution spatiale des espèces exotiques invasives est une étape essentielle pour la mise en place des priorités de gestion pour le contrôle des invasions et la protection des habitats (Collingham et al. 2000, Marvier et al. 2004). Il a été démontré que les populations d'espèces sont structurées de façon spatiale à l'échelle du paysage et que les écosystèmes offrent différents niveaux de résistance à la dynamique et à la dispersion des individus d'espèces. De ce fait, l'analyse de la distribution des espèces invasives à l'échelle du paysage permet de décrire les habitats colonisés par ces espèces, les habitats sensibles à l'invasion et de prédire et comparer les caractéristiques des sites qui favorisent les invasions. Ces estimations permettront d'établir des conclusions sur l'invasibilité des habitats et des écosystèmes (Williamson 1996, Lonsdale 1999).

L'écologie du paysage a pour but de comprendre comment la structure de l'espace influence les patrons et les processus écologiques dont la dynamique des populations (Forman and Godron 1986, Décamps 2004). Dans le cadre des invasions biologiques, différentes notions sont prises en compte en écologie du paysage: (1) le patron de distribution des espèces non-indigènes et les taux de survie dans les habitats, (2) la sélection des habitats dans le paysage et la prise en compte de leurs fonctions, origines, tailles et formes, de même que le rôle des habitats corridors dans la dispersion des espèces, (3) le rôle de l'homme dans la gestion et le développement du paysage et (4) les échelles spatiales et temporelles d'observation et la notion de transposition des résultats d'une échelle à l'autre, voire même, la nécessité d'inscrire toute dynamique locale dans un espace plus vaste (Hanski and Gilpin 1991, Lonsdale 1999, Décamps 2004).

1.4. Le modèle d'étude

1.4.1. Les renouées du Japon s.l.

Le genre *Fallopia* Adanson sensu Holub (1971) appartient à la famille des Polygonaceae et comprend de nombreuses formes biologiques herbacées, annuelles et pérennes, ainsi que des taxons ligneux et des lianes. En Europe, il est représenté par deux espèces indigènes: *F. dumetorum* (L.) Holub, *F. convolvulus* (L.) À Löve, ainsi que l'hybride entre les deux espèces *F. x convolvuloides* (Brügger) Holub, toutes des lianes herbacées annuelles (Lambinon et al. 2004). Les espèces aujourd'hui rassemblées dans le genre autonome *Fallopia* ont autrefois été incluses dans le genre *Polygonum* et le genre *Reynoutria* (Bailey and Stace 1992).

L'appellation commune «renouées du Japon» englobe, dans cette étude, l'ensemble des taxons de *Fallopia* non-indigènes, invasifs ou non, ainsi que leurs hybrides: *F. japonica* (Houtt.) Ronse Decraene (Syn. *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc.), *F. sachalinensis* (F. Schmidt Petrop.) Ronse Decraene (Syn. *Polygonum sachalinense* F.Schmidt ex Maxim.), l'hybride entre les deux espèces *F. x bohémica* (Chrtek et Chrtková) J.P. Bailey, *F. japonica* var. *compacta* (Hook. F.) J.P. Bailey, l'hybride *F. japonica* x *F. japonica* var. *compacta*, la liane pérenne *F. aubertii* (L. Henry) Holub (Syn. *F. baldschuanica* (Regel) Holub), et *F. x conollyana* J.P. Bailey, hybride entre *F. japonica* et *F. aubertii*, mais aussi tous les rétro-croisements entre les hybrides et les espèces parents (Figure 1.2 et Tableau 1.2).

La distinction botanique entre les différents taxons est souvent difficile et a probablement mené à une sous-estimation de la diversité taxonomique chez les renouées du Japon (Petit 2004, Bailey and Wisskirchen 2006).



Fig. 1.2 Photographies de a) *Fallopia japonica*, b) *Fallopia sachalinensis*, c) *Fallopia x bohemica*, d) *Fallopia aubertii*.

1.4.2. *Distribution géographique, habitats et mesures de gestion*

Originaire du Japon, de Corée, de Taiwan et du Nord de la Chine et croissant dans des milieux ensoleillés sur les collines, les hautes montagnes, le long des routes et des fossés, *F. japonica* (Figure 1.2.a) a été introduit en Europe entre 1823 et 1825 à des fins ornementales, fourragères et pour la stabilisation des berges des cours d'eau (Child and Wade 2000, Kim and Park 2000, Bailey 2003a).

Tableau 1.2 Les renouées du Japon dans leur aire d'indigénat et leur aire d'introduction (Bailey 2003a).

Taxon	Catégorie	Aire d'indigénat	Nombre de chromosomes dans l'aire d'indigénat	Distribution dans l'aire d'introduction	Nombre de chromosomes dans l'aire d'introduction
<i>F. japonica</i>	Espèce	Japon, Corée, Taiwan, Nord de la Chine	2n = 44, 88	Europe du Nord, Hongrie, USA, Canada, Australie, Nouvelle Zélande	2n = 88
<i>F. sachalinensis</i>	Espèce	Japon, URSS, Corée	2n = 44, 102, 132	Europe du Nord, USA	2n = 44, 66
<i>F. japonica</i> var. <i>compacta</i>	Variété	Japon	2n = 44	UK, République tchèque	2n = 44
<i>F. x bohemica</i> 8x	Hybride	UK, République tchèque, France, Allemagne	2n = 88	UK, République tchèque, France, Allemagne	2n = 88
<i>F. x bohemica</i> 6x	Hybride	Japon	2n = 66	Europe du Nord, USA, UK, Australie, Nouvelle Zélande	2n = 66
<i>F. x bohemica</i> 4x	Hybride	UK, République tchèque	2n = 44	UK, République tchèque	2n = 44
<i>F. x conollyana</i>	Hybride	UK, République tchèque, Allemagne, Hongrie, Norvège, France	2n = 54	UK, République tchèque, Allemagne, Hongrie, Norvège, France	2n = 54
<i>F. japonica</i> x <i>F. japonica</i> var. <i>compacta</i>	Hybride intra-spécifique	UK, Allemagne	2n = 66	UK, Allemagne	2n = 66
<i>F. japonica</i> x <i>F. x bohemica</i> 6x	Rétro-croisement	Pays de Galles	2n = 77-110	Pays de Galles	2n = 77-110
<i>F. x bohemica</i> (8x) x <i>F. sachalinensis</i>	Rétro-croisement	Pays de Galles	2n = 66	Pays de Galles	2n = 66

Les premières plantes subspontanées ont été constatées dans le milieu du 19^e s et les premiers avis de naturalisation ont été rapportés à la fin du 19^e s. *Fallopia sachalinensis* (Figure 1.2.b) est originaire de l'île de Sakhalin, du Japon et de Corée et a été introduit en Europe entre 1863 et 1869. Très similaire à *F. japonica*, il possède néanmoins de plus grandes feuilles (jusqu'à 40 cm) et une plus grande taille (jusqu'à 5 m). L'hybride hexaploïde *F. x bohemica* (Figure 1.2.c) a été signalé pour la première fois en 1997 au Japon. Dans la zone d'introduction, *F. x bohemica* a été décrit pour la première fois en 1983. Le manque de données relatives à sa distribution avant cette date serait dû à la difficulté des botanistes de la distinguer des espèces parentales *F. japonica* et *F. sachalinensis* (Bailey and Wisskirchen 2006) ou à une expansion récente de l'hybride non encore répertoriée dans les bases de données floristiques. *Fallopia aubertii* (Figure 1.2.d) est originaire du centre de l'Asie et a été introduit en Europe à des fins ornementales. Bien qu'il ne soit pas à proprement parler une plante invasive, il est capable de s'hybrider avec *F. japonica* et a donc été inclus dans les renouées du Japon s.l. Il est connu comme une liane à croissance rapide.

Dans leur aire d'origine, les renouées du Japon croissent sur les bords des cours d'eau et les zones de pâturage avec de fortes teneurs en azote. Les plantes sont capables de survivre dans des conditions environnementales sévères comme les sols acides avec un pH < 4, des sols gelés pendant de longs mois ou des sols à forte teneur en soufre. Elles se reproduisent par graine et par rhizome et forment une composante naturelle de la végétation, concourant à la stabilisation des sols volcaniques et permettant ainsi aux autres espèces de s'établir (Child and Wade 2000).

Dans la zone d'introduction, les renouées du Japon se sont échappées des jardins de culture et colonisent le bord des chemins de fer, des canaux, des rivières, des routes, les habitats rudéraux et les terrains vagues. Elles tolèrent une grande variété de pH (de 3.0 à 8.5) et une grande variété de sols (Beerling et al. 1994, Vanderhoeven et al. 2005). Elles seraient aussi

tolérantes aux sols pollués en métaux lourds ou contenant une forte teneur en sel comme les zones côtières. Elles sont très peu trouvées dans les zones agricoles. Malgré la présence des renouées du Japon dans les habitats précités, l'expansion le long des cours d'eau a été le plus rapportée dans la littérature (Roblin 1988, Beerling 1991, Pyšek and Prach 1993, de Waal 1995, Boyer 2002, Saillard 2002, Voinot et al. 2002, Boyer 2005). Il peut s'agir d'un biais dû aux problèmes de conservation de la nature et de récréation causés par ces plantes dans ces zones (Child and Wade 2000).

Quoiqu'il en soit, les renouées du Japon sont maintenant largement répandues dans les Iles britanniques et en Europe continentale et sont aussi devenues problématiques aux Etats Unis, au Canada, en Australie et en Nouvelle Zélande (Figure 1.3) (Beerling et al. 1994, Child and Wade 2000). Elles seraient toutefois absentes des régions méditerranéennes bien que des études récentes aient montré la présence de *F. x bohemica* dans ces régions (Figure 1.4), étendant ainsi la distribution spatiale des renouées en Europe (Bailey and Wisskirchen 2006). Elles sont classées dans le top 100 des espèces les plus invasives par l'IUCN.

Différentes méthodes de contrôle et d'éradication ont été essayées. Les méthodes mécaniques comme la coupe, la fauche, l'arrachage, le pâturage, l'application de géotextile, la replantation et le bêchage ont été utilisées (Child et al. 1992, Gaillard et al. 2002, Saillard 2002, Boyer 2005). Les herbicides ont aussi été utilisés pour contrôler ces espèces sur le long terme (Roblin 1988, Child et al. 1992, de Waal 1995), ainsi que différentes combinaisons des méthodes sus-citées. Mais à ce jour, l'élimination totale des renouées n'est pas possible. Seule l'expansion des individus peut être empêchée. De nouvelles recherches sont menées pour l'utilisation de la lutte biologique pour le contrôle des renouées du Japon mais ces recherches sont encore en cours d'investigation. Le DEFRA (Department for Environment food and Rural Affairs) au Royaume Uni a estimé à 1.56 milliards de livres sterling le coût pour l'éradication des renouées du Japon dans toutes les zones d'infestations en Grande Bretagne.

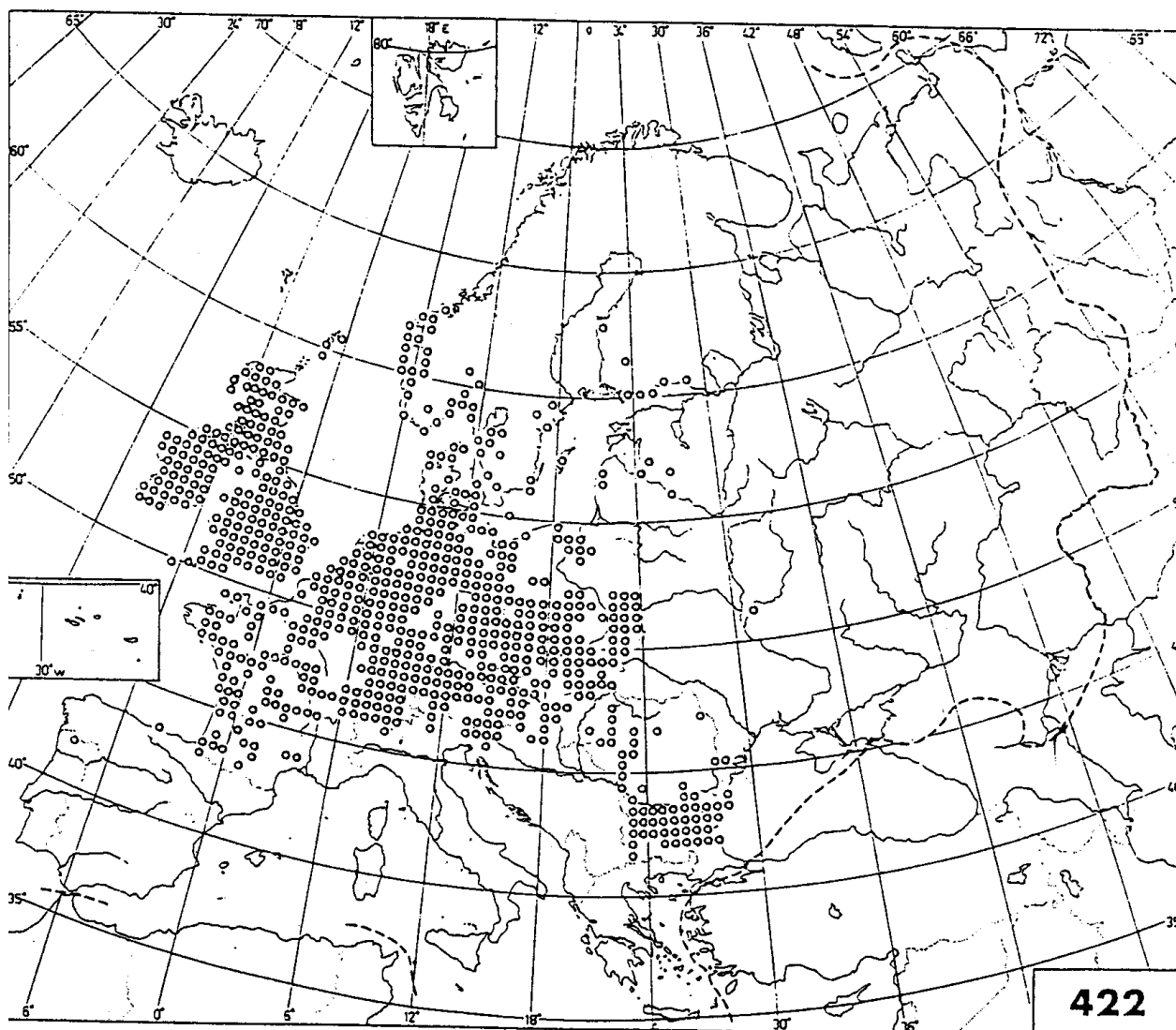


Fig. 1.3 La distribution de *Fallopija japonica* en Europe (Jalas and Suominen 1979).

De nombreux pays européens sont en train de rédiger une législation pour le contrôle de la détention et la plantation des renouées du Japon (Child and Wade 2000). Il est de ce fait nécessaire d'entreprendre des études approfondies pour mieux comprendre les mécanismes écologiques et les processus évolutifs qui favorisent l'invasion des renouées de Japon et leurs effets sur les espèces indigènes et les communautés. Une meilleure compréhension des facteurs intrinsèques et extrinsèques qui sous-tendent l'invasion est une étape importante pour

mettre en place des priorités de gestion pour le contrôle de l'invasion et la protection des habitats et des communautés (Collingham et al. 2000).

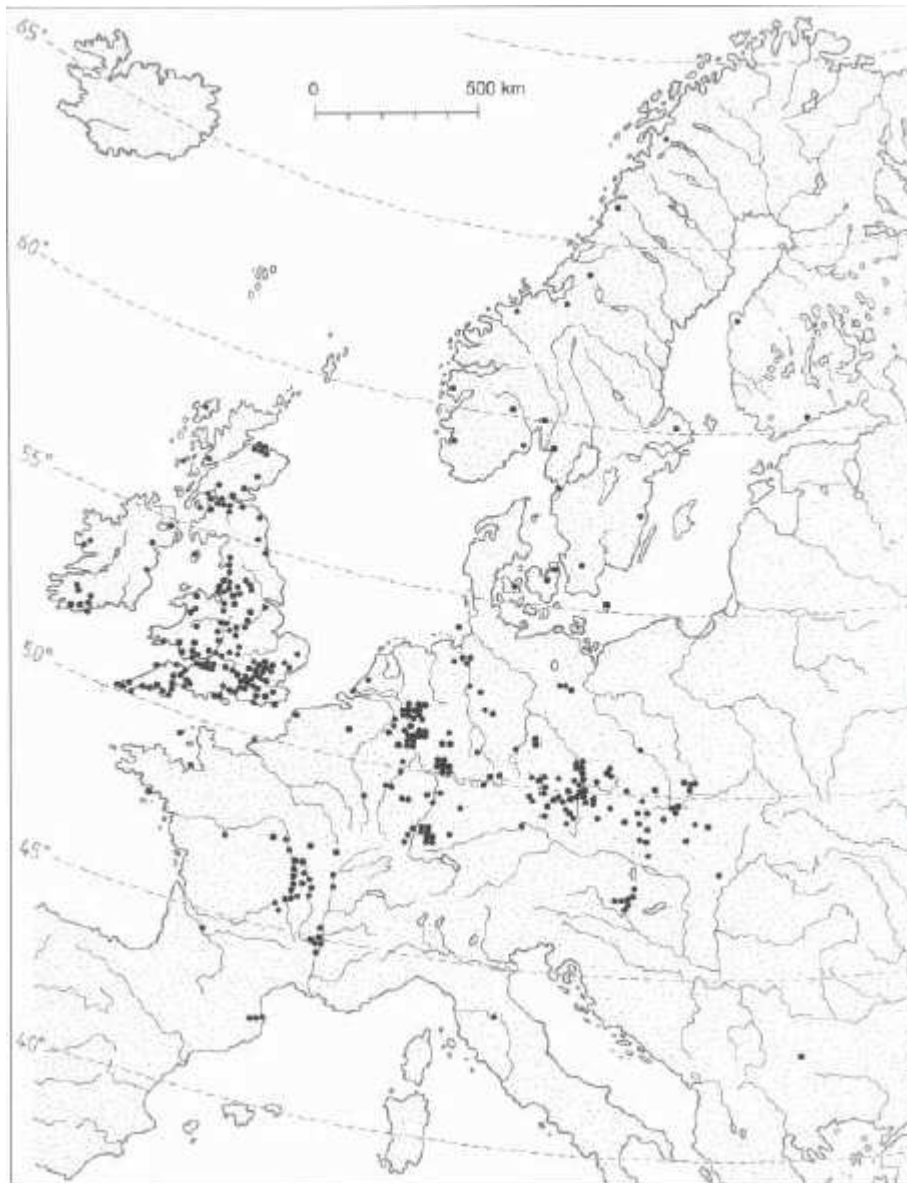


Fig. 1.4 La distribution de *Fallopia x bohemica* en Europe (Bailey and Wisskirchen 2006)

1.4.3. Description

Les renouées du japon possèdent des feuilles généralement alternes, simples, à stipules soudées en un tube membraneux entourant la tige (= ochréa). Le limbe foliaire est subtriangulaire, ovale, elliptique ou lancéolé, cordé, tronqué ou atténué à la base, glabre ou

muni de poils à la face inférieure. L'inflorescence est en forme de racème, d'épi ou de panicule ou constituée de fleurs axillaires. Les tiges aériennes sont soit grimpantes ou couchées (dans ce cas le limbe foliaire est subtriangulaire, cordée-tronqué à sagitté à la base) soit dressées et hautes de (0.3-)1-3(-4) m (dans ce cas, l'inflorescence est en panicule axillaire), pigmentées ou non de rouge. Les fleurs sont à symétrie radiaire, hermaphrodites mais se comportent le plus souvent comme unisexuées (Tableau 1.3): Les fleurs mâles-stériles montrent des petites anthères qui restent incluses dans le péricone et des stigmates bien développés tandis que les fleurs mâles-fertiles ont des anthères bien développées et sont productrices de pollen. Le péricone est rose, pourpré, blanchâtre ou verdâtre, composé de (4-)5 tépales carénés ou ailés sur le dos, sépaloïdes ou pétaloïdes, libres ou un peu soudé entre eux, disposés de façon spiralée avec 4-9(-12) étamines. Les carpelles (2-)3 sont soudés entre eux. L'ovaire est supère, à 1 loge. Le fruit est un akène généralement entouré du péricone persistant et parfois partiellement accrescent (Beerling et al. 1994, Anonyme 2001, Lambinon et al. 2004).

Du point de vue de la phénologie, les tiges aériennes apparaissent généralement en début mars et forment une cépée caractéristique à la mi-juin. La croissance est rapide, de 3 à 5 cm/jour ou plus en milieu humide. Dans cette cépée, les tiges de l'année (vertes et cassantes) se mêlent aux tiges de l'année précédente (sèches et rigides), rendant ainsi la fauche difficile. La floraison intervient généralement en début août et dure environ deux mois. Les fleurs laissent la place aux fruits au début du mois d'octobre. Chaque fleur donne un akène d'abord blanchâtre puis rougeâtre en se desséchant. Les fruits secs sont portés par les tiges de l'inflorescence avant d'être dispersés par le vent ou par l'eau.

Tableau 1.3 Les morphes sexuels des renouées du Japon dans leur aire d'indigénat et leur aire d'introduction (Bailey 2003a).

Taxon	Catégorie	Morphes sexuels dans l'aire d'indigénat	Morphes sexuels dans l'aire d'introduction
<i>F. japonica</i>	Espèce	Les deux sexes sont présents	Seul l'individu mâle-stérile est présent
<i>F. sachalinensis</i>	Espèce	Les deux sexes sont présents	Les deux sexes sont présents
<i>F. japonica</i> var. <i>compacta</i>	Variété	Les deux sexes sont présents	Les deux sexes sont présents
<i>F. x bohémica</i> 8x	Hybride	Les deux sexes sont présents	Les deux sexes sont présents
<i>F. x bohémica</i> 6x	Hybride	Les deux sexes sont présents	Les deux sexes sont présents
<i>F. x bohémica</i> 4x	Hybride	Les deux sexes sont présents	Les deux sexes sont présents
<i>F. x conollyana</i>	Hybride	?	?
<i>F. japonica</i> x <i>F. japonica</i> var. <i>compacta</i>	Hybride intra-spécifique	?	?
<i>F. japonica</i> x <i>F. x bohémica</i> 6x	Rétro-croisement	?	?
<i>F. x bohémica</i> (8x) x <i>F. sachalinensis</i>	Rétro-croisement	?	?

La dispersion dans la zone d'introduction est aussi facilitée par le dépôt accidentel ou volontaire de matériel vivant ou le transport de terre contaminé par des fragments de renouées. Les renouées du Japon ont ainsi été dispersées sur de grandes distances par l'homme (Child et al. 2001). La dispersion des renouées du Japon se fait également par l'eau par arrachage des tiges ou des morceaux de rhizomes et cela permet l'extension des populations des zones fertiles vers les zones moins fertiles, des bords des cours d'eau vers les bords des chemins ou des digues (Anonyme 2001).

Il est supposé que l'expansion des renouées du Japon hors de leur zone d'origine se fait principalement par voie végétative à partir des rhizomes et des tiges aériennes (Beerling et al. 1994). Ce mode de reproduction a été abondamment rapporté dans la littérature anglaise (Brock and Wade 1992, Brock et al. 1995, de Waal 2001) mais l'on dispose de peu de données ce qui concerne l'Europe continentale occidentale et la Belgique en particulier. Les rhizomes forment un appareil souterrain ligneux de grande taille dont la croissance annuelle est importante. Les études ont montré que des petits morceaux frais de rhizomes de l'ordre de 0.7 g sont capables de régénérer une nouvelle plante (Brock and Wade 1992), et un fragment frais de 7.8 g est capable de développer un feuillage en 50 jours dans les conditions naturelles (Beerling 1990). Ces rhizomes peuvent descendre jusque 2-3 m de profondeur et les radicelles nourricières qui se trouvent dans les couches supérieures du sol forment un important feutrage empêchant ainsi la flore indigène de s'installer (Child and Wade 2000). Il a aussi été montré que ces rhizomes produisent des substances allélopathiques qui engendrent des nécroses sur les racines des autres végétaux (Barral 1994). Les rhizomes portent en outre de nombreux bourgeons dormants capables de régénérer de nouvelles tiges aériennes en cas de perturbation dans la croissance annuelle (gel, fauche, etc.). Ce renouvellement perpétuel des tiges aériennes rend la gestion des renouées problématique car la fauche pratiquée de façon précoce stimule dans un premier temps la densité des tiges aériennes. De plus, les morceaux de

rhizomes plus importants sont capables de rester vivants plusieurs années dans le sol (jusque 10 ans) ou à l'air libre et redonner une plante dès que les conditions redeviennent favorables. Ce mode de reproduction permet aux renouées invasives de s'étendre sur des surfaces importantes et de former ainsi de grandes aires clonales qui excluent toute autre forme de végétation et contribue à la banalisation de la flore indigène (Child and Wade 2000).

Jusqu'il y a peu, la reproduction sexuée a toujours été considérée comme de moindre importance chez les renouées du Japon dans la zone d'introduction (Anonyme 2001, Lambinon et al. 2004). Cependant, des études récentes effectuées en Grande Bretagne, en Europe centrale et aux Etats Unis ont démontré que la reproduction sexuée est plus commune qu'on le supposait auparavant et ne doit pas être négligée. Les différents taxons en présence ont la possibilité de s'hybrider et de former des graines avec apparition de plantes polyploïdes ou aneuploïdes qui ajoutent à la diversité génétique des renouées comme le montre la Figure 1.5 (Bailey 1994, Child and Wade 2000, Forman and Kesseli 2003). Les données relatives à la répartition des sexes et l'étendue de l'hybridation en Europe sont disponibles pour la Grande-Bretagne et l'Europe centrale. En Europe continentale occidentale, ces données sont manquantes. De plus, Il a été démontré que l'hybride *F. x bohemica* présente une très grande diversité génotypique. Il présente un fort taux de régénération et serait plus invasif que les espèces parents. Il est de ce fait très difficile à contrôler (Bímová et al. 2003, Pyšek et al. 2003, Mandák et al. 2004). La reproduction sexuée par hybridation entre les espèces de renouées pourrait contribuer au succès invasif de ces taxons et pourrait ajouter une nouvelle dimension dans les mesures de contrôle et de gestion de ces taxons (Child and Wade 2000, Pashley et al. 2003).

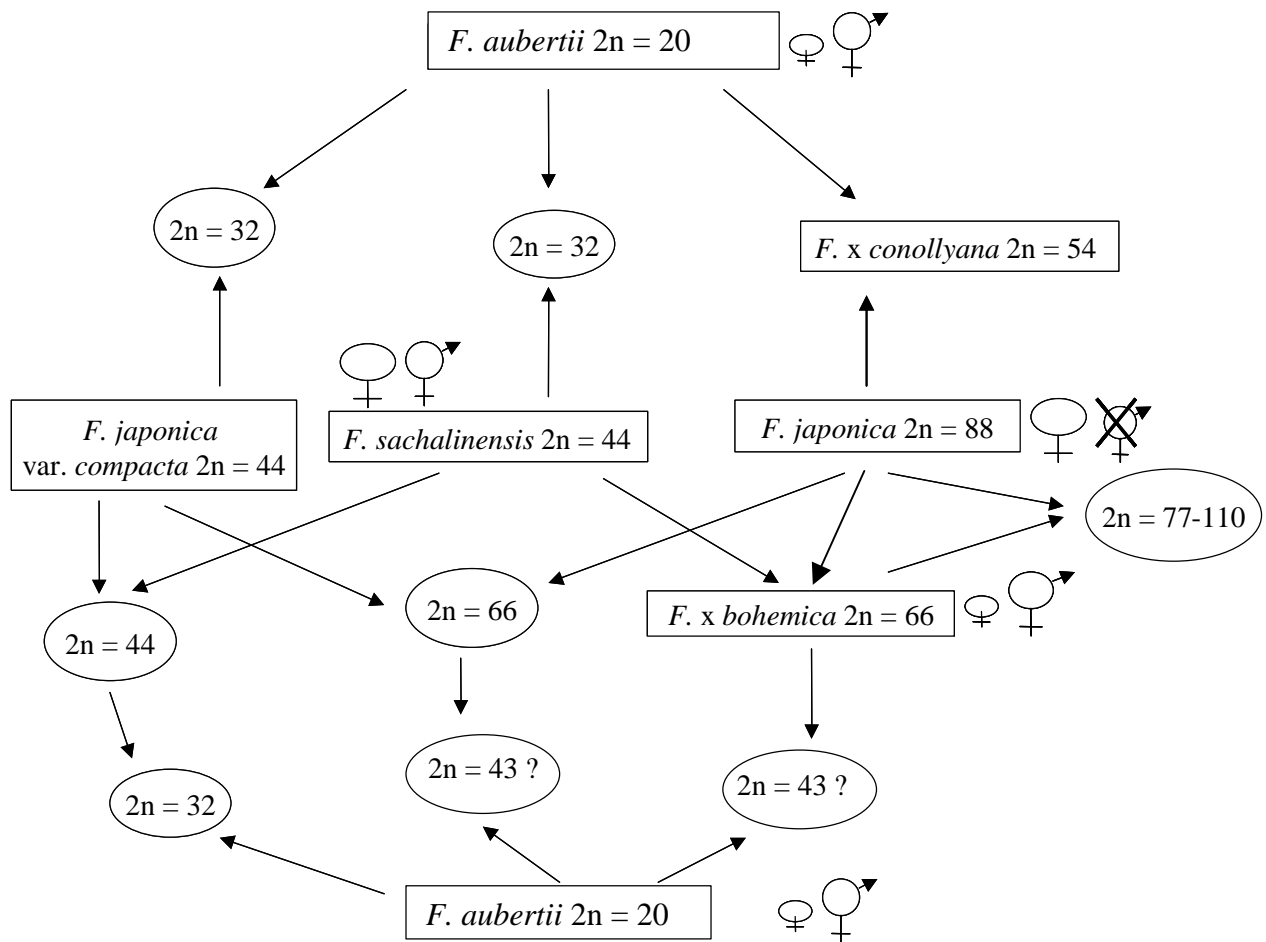


Fig. 1.5 Les différentes possibilités d'hybridation entre les renouées du Japon dans la zone d'introduction (Child and Wade 2000).

1.4.4. Les renouées du Japon en Belgique

Les renouées du Japon font partie des espèces non-indigènes les plus invasives en Belgique et dans les pays avoisinants (Schnitzler 2002, Verloove 2002, Saintenoy-Simon 2003, Boyer 2005). Délibérément introduites pour l'ornementation et le fourrage au début du 19^e siècle (Vanden Berghen 1997), les plantes ont connu un développement spectaculaire après 1945 et sont maintenant largement naturalisées en Belgique et dans les pays avoisinants. D'après Verloove (2006), la première collecte de *F. japonica* par les naturalistes date de 1882 et celle

de *F. sachalinensis* date de 1924. *Fallopia x bohémica* a été collectée la première fois en 1954, *F. japonica* var. *compacta* en 1981 et la liane *F. aubertii* en 1942. Aucune donnée de collecte n'a été rapportée sur les autres hybrides potentiels (voir point 1.4.1.) et les rétro-croisements entre les hybrides et les espèces parents.

Sur le plan taxinomique, cinq taxons ont été décrits dans la nouvelle flore de Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines: les quatre taxons érigés, pérennes et rhizomateux, *F. japonica*, *F. sachalinensis*, *F. x bohémica* et *F. japonica* var. *compacta*, ainsi que la liane pérenne *F. aubertii* (Lambinon et al. 2004). Cette cinquième édition de la flore indique que ces taxons se retrouvent à l'état subspontané, naturalisé çà et là, assez rare à rare (*F. aubertii*, *F. sachalinensis*, *F. x bohémica*), naturalisé dans tous les districts et très envahissant (*F. japonica*), ou encore cultivé et ornemental (*F. japonica* var. *compacta*). *Fallopia x bohémica* y est renseigné comme rare et décrit comme un hybride d'origine horticole.

La distribution spatiale des renouées du Japon, *F. japonica* et *F. sachalinensis* a été cartographiée en Belgique en 1979 (Van Rompaey and Delvosalle 1979). Depuis lors, des données brutes de recensement des espèces non-indigènes existent dans la banque de données de l'IFBL: Institut Floristique Belgo-Luxembourgeoise (de 1972 à 1992), à l'association publique de Flandre: Flo.Wer: Floristische Werkgroepen (de 1992 à maintenant) et à l'A.E.F.: Association pour l'Etude de la Floristique (de 1992 à maintenant) mais ces données sont digitalisées à l'échelle régionale. Nous pouvons ainsi citer les travaux de l'association Flo.Wer sur l'atlas de la flore de Flandre et de Bruxelles capitale (Figure 1.6) (Van Landuyt et al. 2006), les travaux de l'A.E.F. sur la répartition des plantes non-indigènes invasives en Wallonie (Figure 1.7) (Saintenoy-Simon 2003, 2006) et ceux de l'IBGE sur l'atlas de la flore de la Région de Bruxelles-Capitale (Schamp and Hannequart 1999). Aucune carte de distribution des renouées hybrides *F. x bohémica* n'existe à ce jour en Belgique.

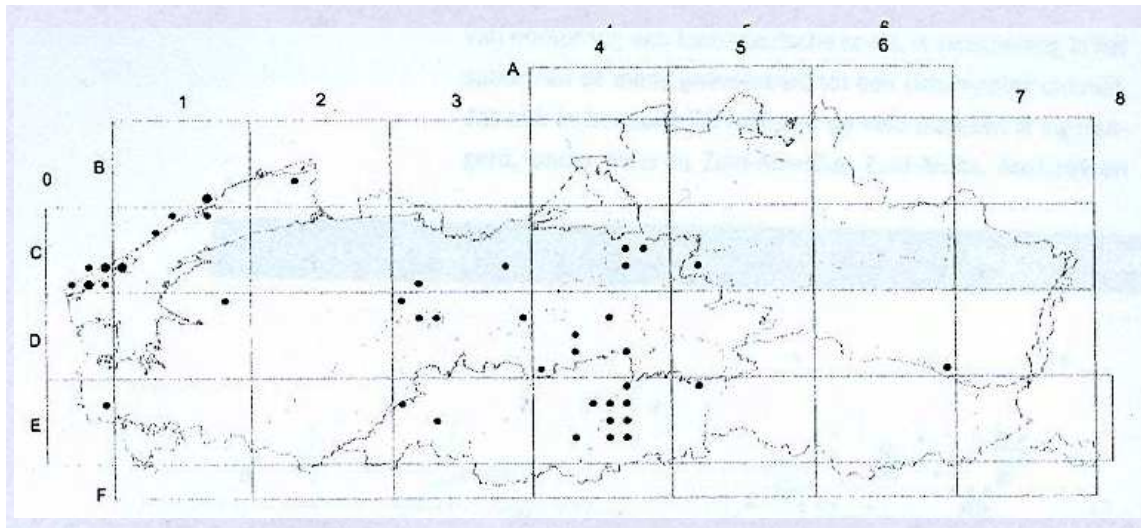
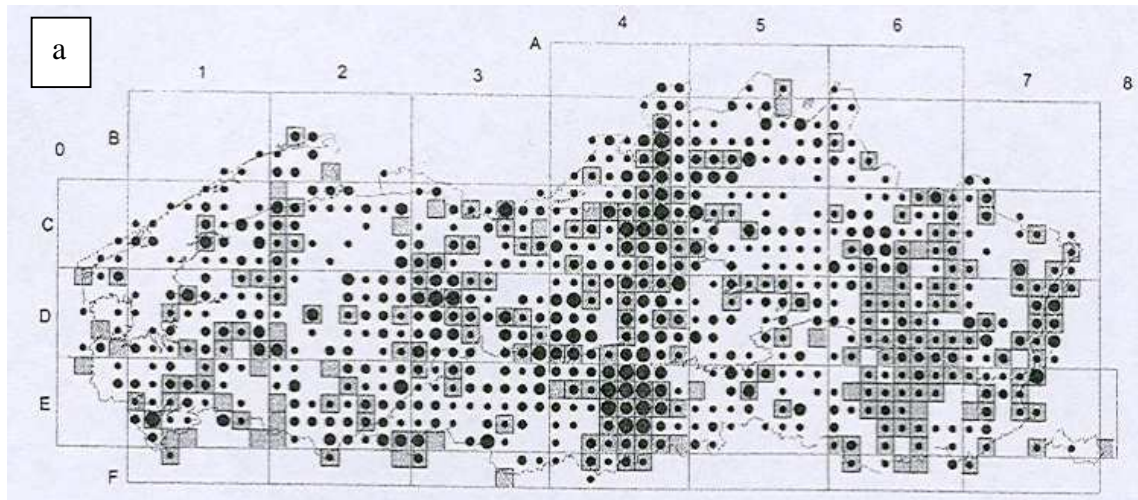


Fig. 1.6 La distribution de a) *Fallopia japonica*, b) *Fallopia sachalinensis*, c) *Fallopia auber* Région flamande de Belgique (Van Landuyt et al. 2006)

c

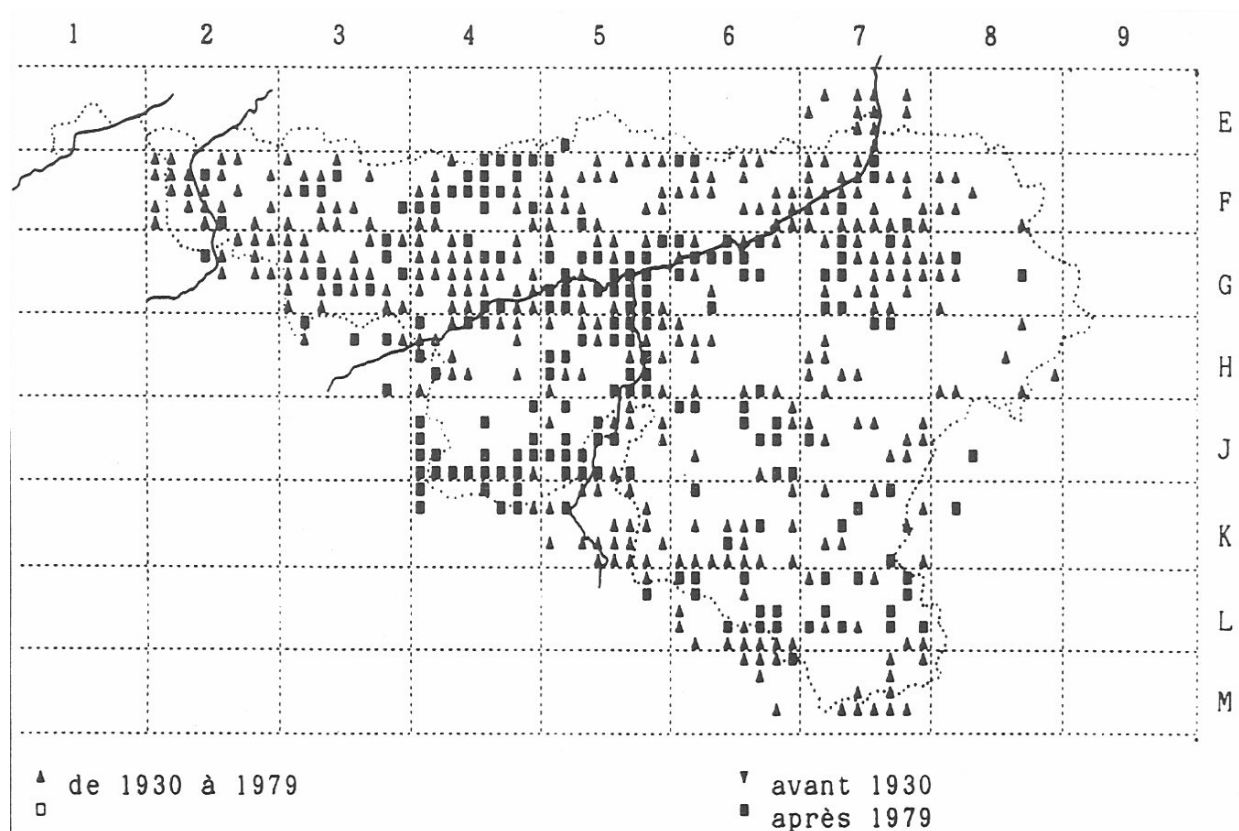


Fig. 1.7 La distribution de *Fallopia japonica* en Région wallonne de Belgique (Saintenoy-Simon 2006)

Un projet 'Atlas 2010' de la flore de Belgique a débuté (Saintenoy-Simon 2007). Les partenaires de ce projet sont l'A.E.F., le Jardin Botanique National de Belgique, le CRNFB (Centre de Recherche de la Nature, des Forêts et du Bois), l'O.F.F.H. (Observatoire Faune-Flore-Habitats) et la FUSAGx (Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux).

D'autres travaux se sont intéressés aux taux d'expansion des renouées du Japon en Belgique. La comparaison des relevés par quadrillage effectuée d'après la méthode mise au point par l'Institut Floristique Belgo-Luxembourgeois en Belgique a montré à Bruxelles une augmentation de la fréquence de *F. japonica* de 65% en 50 ans (Godefroid 1996). D'autres études ont tenté d'identifier les habitats envahis par les renouées du Japon en Belgique (Pieret

et al. 2005) et France (Boyer 2002, Voinot et al. 2002, Boyer 2005), mais ces études sont descriptives et souvent concentrées sur l'envahissement le long des cours d'eau. Récemment, le projet INPLANBEL: Invasive plants in Belgium: Patterns, Processes and Monitoring financée par la politique scientifique belge (contrat EV/11/27C) a permis d'explorer différents aspects des invasions biologiques en Belgique. Ce projet a permis de réaliser une liste structurée des espèces non-indigènes avec une évaluation de leur succès invasif, une analyse combinée des caractéristiques des espèces invasives et des écosystèmes envahis qui prend en compte les traits écophysologiques comme base d'estimation du risque au stade pré-invasif et des études de cas d'espèces invasives dont les renouées du Japon en relation avec l'occupation du sol. Les articles scientifiques de synthèse du projet INPLANBEL sont en cours d'élaboration (<http://www.belspo.be/belspo/fedra/proj.asp?l=fr&COD=EV/27>). Nous pouvons néanmoins citer les travaux de Vanderhoeven et al. (2005) sur l'impact de quatre plantes invasives dont *F. japonica* sur les propriétés du sol dans des parcelles de végétation envahie et dans des parcelles de végétation non envahie. Cette étude a permis de montrer un accroissement de la productivité primaire nette en présence des espèces invasives et un accroissement des concentrations en substances nutritives dans le sol en présence de *F. japonica*. Nous pouvons également citer les travaux de Pieret et collaborateurs (Données non publiés) sur l'influence de la structure de deux paysages écologiques sur la distribution et la dynamique des populations de six taxons invasifs dont les renouées du Japon. Cette étude a montré que les renouées du Japon sont les espèces les plus répandues dans les deux paysages étudiés après *Impatiens glandulifera*. Les prairies naturelles ou semi-naturelles et les habitats urbains industrialisés sont les habitats préférés par les renouées du Japon.

1.5. Conclusion

Il ressort de cette analyse bibliographique que la plupart des études sur les renouées du Japon dans l'aire d'introduction ont été menées en Grande-Bretagne et en République tchèque (Bailey and Stace 1992, Brock and Wade 1992, Bailey 1994, Beerling et al. 1994, Hollingsworth et al. 1998, Bailey 2003a, Bímová et al. 2003, Pyšek et al. 2003, Mandák et al. 2004). Très peu d'études ont été effectuées en Europe continentale occidentale et en Belgique en particulier. Dans la majorité des cas, ces études se sont focalisées sur la multiplication végétative et les traits écophysologiques des espèces et des écosystèmes qui favorisent l'invasion. L'étude de la reproduction sexuée, de l'hybridation et du potentiel d'évolution des renouées du Japon a reçu peu d'attentions de la part des chercheurs. On ne dispose pas à ce jour de données quantitatives sur le statut sexuel des espèces, le potentiel de reproduction sexuée et de dispersion par graine, l'étendue de l'hybridation et ses conséquences évolutives, mises en relation avec le succès invasif des renouées du Japon en Europe continentale occidentale. Des études additionnelles doivent être menées en Europe continentale occidentale en terme de recherche intégrée qui examine à la fois les mécanismes écologiques et les processus évolutifs qui favorisent l'invasion des renouées du Japon ainsi que leurs conséquences évolutives.

1.6. Objectifs et organisation de la dissertation

L'objectif général de cette thèse est d'étudier la biologie des populations de renouées du Japon en Belgique afin de préciser le statut sexuel des taxons en présence, d'analyser le potentiel de reproduction sexuée et de dispersion par graines et d'examiner l'étendue de l'hybridation et ses conséquences évolutives. Cette étude va compléter les informations

disponibles sur la multiplication végétative et sexuée des espèces en vue de promouvoir le développement de stratégies de gestion intégrée pour le contrôle de l'invasion et la protection des habitats. De façon spécifique, cette thèse vise à (A) Examiner le patron d'hybridation et ses conséquences évolutives, (B) Evaluer la capacité de reproduction sexuée et la contribution de l'hybridation au succès invasif des taxons et des hybrides, (C) Analyser la distribution spatiale et la dynamique de colonisation des espèces parentales et des hybrides à l'échelle du paysage.

Outre ce premier chapitre introductif, la dissertation comprend trois chapitres expérimentaux rédigés sous formes d'articles publiés ou soumis à publication et une discussion générale. Chaque chapitre constitue une entité indépendante qui possède ses propres objectifs et permet de répondre aux questions suivantes:

- (1) Quelle est l'étendue de l'hybridation en Belgique et comment peut-elle être comparée aux autres régions d'Europe? Existe-t-il des traits morphologiques qui permettent de différencier les taxons et leurs hybrides sur le terrain? (Chapitre 2).
- (2) L'hybridation influence-t-elle la reproduction sexuée des renouées du Japon en Belgique? Et contribue-t-elle au succès invasif des taxons? (Chapitre 3).
- (3) Quelles sont les habitats colonisés par les espèces en Belgique? Les taxons et hybrides de *Fallopia* diffèrent-ils dans leur dynamique de colonisation des taches d'habitats à l'échelle du paysage? (Chapitre 4).

Annexe



Annexe 1.1 La végétation sous une population de *Fallopia japonica*.

Chapter 2 : Hybridization and morphogenetic variation in the invasive alien *Fallopia* (Polygonaceae) complex in Belgium (western Europe)¹

Abstract. Hybridization is now recognised as one of the driving forces in the evolution of invasive alien species in their introduced range. In biological invasions, identification at the sub specific level is a key feature because it determines the number of taxa involved and allows more effective management of them. The invasive alien knotweeds, *Fallopia* spp. (Polygonaceae), are some of the most troublesome invasive species in Europe and North America. It has been hypothesized that invasive success in *Fallopia* may be enhanced by the genetic consequences of multiple hybridisation events. We examine the pattern of hybridization and its evolutionary consequences in Belgium (Western Europe). The concerted analysis of ploidy levels (chromosome counts and flow cytometry), morphological variation and genetic variation (RAPDs) confirm that at least four taxa with different ploidy levels take part in the pattern of invasion in Belgium. Hybrid *F. x bohemica* with various chromosomes numbers was found. We demonstrate the restoration of genotypic diversity in the hybrid *F. x bohemica* that was lacking in the parental species. Using assignment tests, we demonstrate that hybrid genotypes are mainly assigned to a specific genetic pool and not to a mixture between the genetic pools of the putative parental species as would be expected for hybrids. Parental species and hexaploid hybrids differ significantly for a set of well-defined morphological characters, which will enable future researchers to distinguish these taxa. Our results show that the importance of hybridization has probably been underestimated in large parts of the adventive range of the alien *Fallopia* species. This points to the importance of

concerted molecular and morphological analysis in the study of the evolutionary consequences of hybridization.

Key words: Assignment test, Belgium, chromosome counts, *Fallopia*, flow cytometry, hybridization, morphology, Polygonaceae.

¹ Marie -S. Tiébré, Jean -P. Bizoux, Olivier J. Hardy, John P. Bailey and Grégory Mahy. American Journal of Botany. In press.

2.1. Introduction

Biological invasions are considered the second cause of biodiversity loss worldwide, and have attracted much attention in the last decade (Vitousek et al. 1997, Wilcove 1998, Gurevitch and Padilla 2004, Didham et al. 2005). Interspecific hybridization is now recognised as a major mechanism of evolution in the plant kingdom, such hybridizations between introduced or related species are implicated as a driving force of evolutionary processes in invasions (Abbott 1992, Ellstrand and Schierenbeck 2000, Vilà et al. 2000, Eunmi 2002, Hänfling and Kollmann 2002, Callaway and Maron 2006). Hybridization may increase genetic diversity in introduced taxa and provide the genetic material on which selection and genetic drift may act to promote population differentiation. Both genotypic and genomic alterations may stimulate invasiveness of newly formed species (Ellstrand and Schierenbeck, 2000) by inducing rapid evolution and may facilitate the invasion by some of them (Grosholz 2002, Allendorf and Lundquist 2003, Müller-Schärer et al. 2004). Human activities have provided new opportunities and new niches that may better suit the hybrids than the parents (Vilà et al. 2000). This is shown in *Senecio* (Abbott 2000), *Tragopogon* (Soltis et al. 2004) and *Spartina* (Ainouche et al. 2003).

However, the identification of newly formed hybrids using morphological characters can be difficult and lead to an underestimate of the true extent of species diversity processes (Petit 2004, Hegarty and Hiscock 2005, Lopez et al. 2005, Mallet 2005). Identification at the sub specific level is a key feature in the studies of invasive species because it determines the number of taxa involved and allows more effective management of them (Child and Wade 2000, Sakai et al. 2001, Simberloff 2003). The combination of morphological and molecular analyses may be an efficient tool for differentiating taxa within complex populations (Fjellheim et al. 2001, Persson and Gustavsson 2001, Cattell and Karl 2004) and RAPD

analyses are shown to be useful in the identification of clonal plants (Hansen et al. 2000, Torimaru et al. 2003).

The genus *Fallopia* offers an excellent opportunity to analyse the genetic and evolutionary consequences of hybridization and polyploidization in an invasive clonal plant, as it provides well-documented interspecific hybridization events (Bailey 2003a). The octoploid Japanese knotweed *F. japonica* var. *japonica* ($2n = 88$) was introduced to Europe in the 19th century as an ornamental and fodder plant, along with the related tetraploid *F. sachalinensis* ($2n = 44$). These plants have rapidly expanded in Europe and Northern America (Godefroid 1996, Fojeik and Tokarska-Guzik 2000, Hollingsworth and Bailey 2000b, Verloove 2002, Bímová et al. 2003, Weber 2003), with huge impacts, such as modifications of nutrient cycling rates and topsoil fertility and decreasing plant species diversity of invaded sites (Vanderhoeven et al. 2005).

In their native range *F. japonica* var. *japonica* and *F. sachalinensis* reproduce by a combination of sexual reproduction, with hermaphrodite and male-sterile stands (Tanaka 1966), and by vegetative regeneration (Maruta 1976). In most of its introduced range, *F. japonica* var. *japonica* is found to be male-sterile (Bailey 1989; Tiébré et al., 2007) and genetic studies suggest that all stands derive from a single clone by vegetative propagation (Bailey 1989, Hollingsworth and Bailey 2000b). In contrast, *F. sachalinensis* has both male-sterile and hermaphrodite individuals in its introduced range (Bailey 1994, Tiébré et al. 2007) and exhibits higher genotypic diversity suggesting multiple introduction events and/or in situ sexual reproduction (Bailey 1989). Other members of the genus introduced to Europe are *F. japonica* var. *compacta*, tetraploid ($2n = 44$), rare, with both female and hermaphrodite stands, and *F. aubertii* (Syn. *F. baldschuanica*), diploid ($2n = 20$) and hermaphrodite, rare in the nature but nowadays commonly cultivated as ornamental plant (Bailey 1994, Tiébré et al. 2007).

Hybridization of the widespread *F. japonica* var. *japonica* with *F. sachalinensis* resulted in the most troublesome hybrid, *F. x bohémica*. *Fallopia x bohémica*, with various chromosome numbers from tetraploid to octoploid, has both male-sterile and hermaphrodite individuals with partial to full fertility (Bailey et al. 1996, Tiébré et al. 2007). While in the UK Bailey reported seed set in *F. x bohémica* despite very irregular meiosis, in Belgium Tiébré et al. (2007) found very low seed set. Studies of these hybrids at local and country levels in the UK and the Czech Republic, using cytological and molecular approaches show high genotypic diversity. This may be the result of a combination of multiple hybridization events, hybrid fertility or multiple introductions from horticulturalists (Hollingsworth et al. 1998, Hollingsworth et al. 1999, Hollingsworth and Bailey 2000b, Pashley et al. 2003, Mandák et al. 2005). The hybrid *F. x bohémica* seems to be more invasive than its parents (Mandák et al. 2003, Pyšek et al. 2003). Other hybridization events may also play a role in the dynamics of the *Fallopia* complex. A significant proportion of open-pollinated seeds collected from 4x *F. x bohémica*, *F. japonica* var. *japonica*, *F. sachalinensis*, and *F. japonica* var. *compacta* in the UK and Belgium is shown to result from hybridisation with *F. aubertii* (Bailey 1988, Tiébré et al. 2007). But in the UK, only a minute proportion germinate and establish in nature (Bailey 2001). Additional data from other parts of the adventive range are needed to assess the relative importance of the different hybridization possibilities within the *Fallopia* complex.

Although studies on the variation of invasive alien *Fallopia* taxa have been conducted in the UK and the Czech republic, we are still lacking firm evidence on the relative roles of sexual reproduction and multiple hybridization events in shaping the genetic diversity of *F. x bohémica* (Hollingsworth and Bailey 2000b), and on the extent of differentiation that may be generated among geographically distant groups of hybrids as a result of independent evolution under limited gene flow. In addition, it seems that the importance of hybrid *F. x bohémica*

varies from one region to another in the adventive range. This points to potential different evolutionary processes on a regional basis in these invasive taxa (Bailey and Wisskirchen 2006, Pashley et al. 2007, In press). New evidence may be gained by combining in the same study cytological information, molecular markers and morphological characters.

In this study, we examine the polyploid alien *Fallopia* species and their hybrids to examine the evolutionary consequences of hybridization in an invasive plant complex. Specifically, we focus on consequences on genetic and morphological variation. Combining chromosome counts, flow cytometry, RAPD markers and morphological analysis, we ask the following specific questions: (1) What is the extent and pattern of hybridization in the invasive *Fallopia* complex in Belgium and how does it compare with other European regions? (2) Does hybridization increase genotypic diversity and are groups of hybrids in different areas genetically differentiated? (3) Are there reliable morphological characters for separating all these taxa?

2.2. Materials and methods

2.2.1. Materials

Five exotic *Fallopia* taxa are reported in Belgium: four erect rhizomatous perennials, *F. japonica* var. *japonica* (Houtt.) Ronse Decraene, *F. sachalinensis* (F. Schmidt Petrop.) Ronse Decraene, *F. x bohemica* (Chrték et Chrtková) J.P. Bailey, and the rare *F. japonica* var. *compacta* (Hook. F.) J.P. Bailey; and one climbing perennial *F. aubertii* (L. Henry) (Syn. *F. baldschuanica* (Regel) Holub (Lambinon et al. 2004).

This study was carried out in six different areas of Belgium: Brussels, Ceroux-Mousty, Comblain-au-pont, Gembloux, Jodoigne, and Namur (Figure 2.1, Table 2.1).

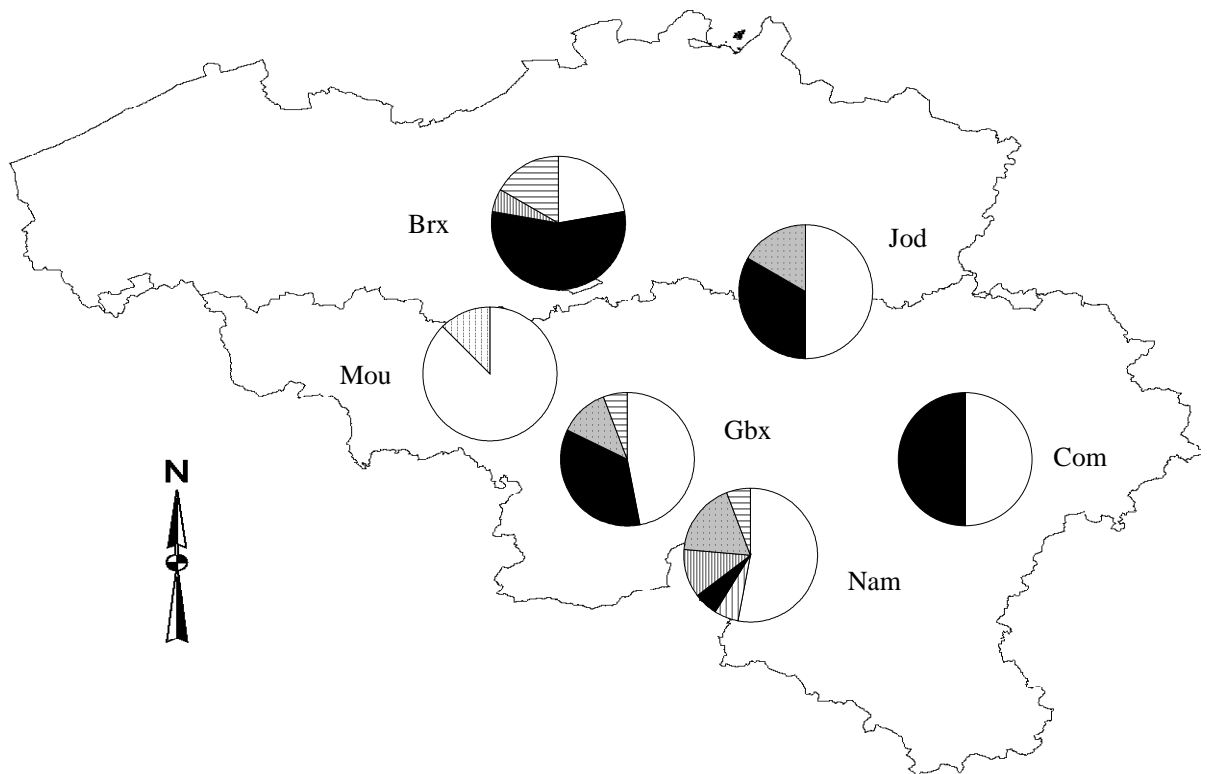


Fig. 2.1 Location of sampled areas in Belgium and relative importance of the different *Fallopia* taxa identified on the basis of combined results of morphology, cytology and RAPD. White section represents *F. japonica* var. *japonica*. Black section represents *F. x bohémica* 6x. Grey section represents *F. aubertii*. Horizontal hatched section represents *F. sachalinensis*. Vertical hatched section represents *F. x bohémica* 8x. Black square section represents *F. x bohémica* 4x-6x. Light grey square section represents a hybrid individual erroneously identified as *F. japonica* var. *compacta* initially. Areas are indicated by the locality code (Table 1). Scale = 1/1584590.

Table 2.1 Location, area code, and sample sizes of the *Fallopia* individuals analysed for RAPDs variation, morphological variation, flow cytometry, and chromosome counts.

Code	Locality	Latitude	Longitude	Number of individuals for								
				RAPDs	Morphology	Flow cytometry	Chromosome counts	<i>F. auberti</i>	<i>F. x bohemica</i>	<i>F. japonica</i> var. <i>japonica</i>	<i>F. japonica</i> var. <i>compacta</i>	<i>F. sachalinensis</i>
UK	Cirencester, UK	51°42' N	1°58' W	2	0	2	2		2			
Jod	Jodoigne, Belgium	50°43' N	4°52' E	6	5	4		1	2	3		
Nam	Namur, Belgium	50°27' N	4°51' E	17	22	12	3	3	4	9		1
Gbx	Gembloux, Belgium	50°33' N	4°41' E	17	15	14	11	2	6	8		1
Brx	Brussels, Belgium	50°50' N	4°21' E	18	16	16			11	4		3
Com	Comblain-au-pont, Belgium	50°28' N	5°34' E	18	15	18			9	9		
Mou	Ceroux-Mousty, Belgium	50°39' N	4°30' E	8	6	7	0			7	1	
Kel	Kelmis, Belgium	50°43' N	6°00' E	1	0	0						1

Each area represented a contrasted landscape ranging over several hundreds of hectares. The collection areas were chosen to cover the range of morphological variation of the *Fallopia* observed in the field in previous surveys. Because of the high potential for vegetative multiplication, a single individual (genet) of *Fallopia* spp. may cover many hundred square meters and it is expected that most *Fallopia* stands contained only a single clone. Generally, a high density of erected ramets (2-3 m height) characterized those stands. As we were interested in genetic variation and hybridization patterns, and not in local clonality within stands, only one sample was collected per stand. When more than one ramet was needed (i.e. for morphological variation), they were chosen close to each other in order to ensure they came from the same rhizome. We then consider that each sample represents, a priori, a single unique individual.

Ideally 15-18 individuals were selected per area. Each individual was tentatively assigned to a taxon using published morphological characters (Barral 1994, Beerling et al. 1994, Jager 1994, Lambinon et al. 2004). Because of the scarcity of the taxa in study areas, an additional *F. sachalinensis* was collected from Kelmis. Only one individual of putative *F. japonica* var. *compacta* was found in the study areas (Ceroux-Mousty). This individual was found after the main sampling period and then chromosome counts could not be completed on it. Two reference individuals of 4x *F. x bohemica* from Cirencester (UK) with known chromosome numbers were also included. The collection comprised 40 putative *F. japonica* var. *japonica*, 6 putative *F. sachalinensis*, 34 putative *F. x bohemica*, 1 putative *F. japonica* var. *compacta* and 6 putative *F. aubertii* (Table 2.1). From each individual, a piece of rhizome or cutting was potted and cultivated in a greenhouse at 22°C and a 16h day for chromosome counts, flow cytometry and DNA analysis. Basal leaves and stems were collected in the field, mounted and dried for morphological studies. A total of 87 individuals was used for RAPD analysis and of

these 79 underwent morphological examination, 73 were subjected to flow cytometry and 16 were used for chromosome counts.

2.2.2. *Determination of the ploidy level*

Chromosomes were counted on individuals representing the different taxa: 5 individuals of *F. japonica* var. *japonica*, 7 *F. x bohémica*, 1 *F. sachalinensis*, 1 *F. aubertii*. The two individuals of 4x *F. x bohémica* from Cirencester were also included. For each individual, chromosomes were counted on seven nuclei using fresh roots tips according to the method developed by Bailey and Stace (1992).

Flow cytometry was used on 73 individuals including 35 putative *F. japonica* var. *japonica*, 33 individuals of putative *F. x bohémica*, 2 individuals of putative *F. aubertii*, 2 individuals of putative *F. sachalinensis*, and 1 individual of putative *F. japonica* var. *compacta*. We followed the technique of Tiébré et al. (2007). A tetraploid individual *F. sachalinensis* of known chromosome number was used as internal standard for each measurement.

2.2.3. *RAPD analysis*

To determine genetic variation and relationships within and among groups of *Fallopia* with different ploidy levels, we used RAPD markers on 6 individuals of putative *F. sachalinensis*, 6 individuals of putative *F. aubertii*, 40 individuals of putative *F. japonica* var. *japonica*, 34 individuals of putative *F. x bohémica*, and one individual of putative *F. japonica* var. *compacta*.

Total genomic DNA was isolated from 100 mg of fresh leaves from cultivated pot plants using the CTAB method (Doyle and Doyle 1990). For the RAPD-PCR a reaction mixture of

25 µL per sample was used; this consisted of 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP (Fermentas GmbH), 0.4 µM primer, 1 unit *Taq* polymerase (New England Biolabs, Inc.), 0.2 mg/mL BSA (Fermentas GmbH) and 30 ng template DNA. Amplification was performed using a PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research) programmed for an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 44 cycles of 20 sec at 94°C, 1 min at 36°C, 1 min at 72°C and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were run on a 1.8% agarose gel in TAE stained with ethidium bromide. Forty-one primers derived from Operon10-mer kit (Operon technology, Inc.) were initially screened on 10 samples to test for reproducibility and polymorphism. Eight primers (A10, A19, G06, J12, M10, M15, R11, T07) that yielded reproducible and unambiguous polymorphic fragments were used for full analysis of all plants. The presence or absence of DNA fragments was scored. To check for reproducibility among PCR runs, DNA from each individual was genotyped twice. The profiles of the individuals used in the primer test were also compared with those of the same individuals in the full RAPD analysis.

2.2.4. *Morphometric analysis*

To assess the level of phenotypic variability within and among groups of *Fallopia* and determine morphological characters that readily discriminate among them, the mean measurements of 12 morphological characters (Figure 2.2) and ratios were assessed on three leaves and three stems per individual. The leaves were chosen to represent a same development stage. They were the most developed leaf of an adult stem and were generally situated in the basal part of the stem. These measurements were carried out on 41 individuals of putative *F. japonica* var. *japonica*, 28 individuals of putative *F. x bohemica*, 4 individuals of putative *F. sachalinensis*, and 6 individuals of putative *F. aubertii*.

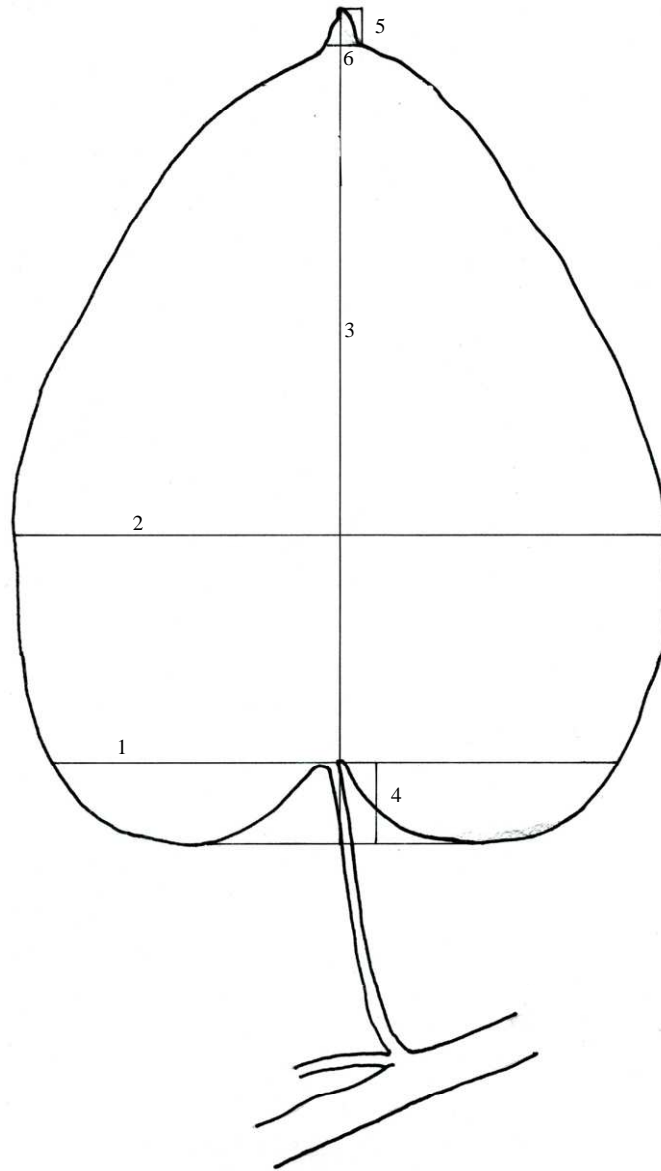


Fig. 2.2 Morphological characters analysed in the invasive alien *Fallopia* in Belgium. (1) Leaf basal width; (2) leaf central width; (3) leaf length; (4) leaf cord length; (5) leaf apex length; and, (6) leaf apex width.

The characters examined were those most often used in the literature for identification of *Fallopia* species (Barral 1994, Beerling et al. 1994, Jager 1994, Lambinon et al. 2004): (1) basal width, (2) central width, and (3) length of leaves; (4) length of the cord, measured from the base of the leaf to the top insertion of the petiole; (5) length and (6) width of the leaf apex; (7) number of hairs on 1 cm x 1 cm and (8) mean length of three hairs per leaf, measured on

the back of the leaf; (9) stem diameter measured at 20 cm from the base (Fig. 2.2). Three character ratios were also computed: (10) cord length; leaf length, (11) leaf basal width; leaf length, and (12) apex width; apex length. As the putative *F. japonica* var. *compacta* was only found during the course of the study, morphological analyses were not included for this taxon, nor for the two specimens from Cirencester.

2.2.5. *Statistical analysis*

In order to determine whether groups of *Fallopia* taxa, identified by flow cytometry, could be classified into genotypic groups, RAPD data were subjected to a principal coordinate analysis (PCO) and a Bayesian model-based clustering method. The PCO allows a visualisation of genetic distance data without assuming a hierarchical topology and provides a description of the main structures of distances matrices in the form of factor maps. The PCO was based on a matrix of between-individual Dice similarities computed from the binary RAPD data and performed using GenAlex 6 program (Peakall and Smouse 2006). The Bayesian-based cluster analysis was performed on the RAPD data using Structure 2.1 program (Pritchard et al. 2000). The method uses MCMC to estimate allele frequencies and assign individuals probabilistically to distinct gene pools, or jointly to two or more gene pools if their genotypes indicate that they are admixed. Because of the dominant marker used, each locus was coded as known for one copy and unknown (coded -9 as recommended) for the other. In order to obtain data strictly from the genetic information, we did not use prior information regarding species identity. Analyses were performed under the admixture model. Four independent runs were carried out for each value of K (numbers of clusters assumed) between 2 and 8, with parameters and model likelihood estimated at over 200,000 MCMC iterations following a burn-in period of 50,000 steps. The K value associated with the maximum value of log

likelihood of data [$L(K)$] was analysed to identify the number of clusters that best described the data. However, as Evanno et al. (2005) showed that this method does not always provide a correct estimation of K , the ΔK statistics based on the rate of change of $L(K)$ between successive values of K was calculated to infer the appropriate number of clusters. The value of K corresponding to the highest value of ΔK was then retained (Evanno et al. 2005). For each individual, we assessed its mean percentage of membership (q_{mean}) to each of the K genetic clusters based on the four independent runs.

The morphometric data were subjected to a principal components analysis (PCA) to assess the level of phenotypic variability within and among groups of *Fallopia*. Moreover, to identify morphological characters that fully discriminate between groups of *Fallopia* taxa, comparisons between taxa (only those with a sufficient number of samples) were performed on the mean measurements of the morphological characters using the one-way ANOVA followed by the Tukey HSD post hoc test, and performed on \log_{10} -transformed measurements for length of hair, stem diameter, basal width of leaf, length of the cord, width of the leaf apex, and performed on arcsine transformed measurements for the ratios cord length; leaf length and leaf basal width; leaf length. We used the Kruskal-Wallis test followed by the non-parametric Mann-Whitney test for central width of leaf, length of leaf, length of the leaf apex, the ratio apex width; apex length, and number of hairs, as the distributions of these variables could not successfully be normalized. These statistics were performed using XLSTAT 6.0 (Addinsoft).

2.3. Results

2.3.1. Ploidy levels

Five chromosome numbers were found in the 16 individuals examined: 20 ($N = 1$); 44 ($N = 3$); 44-67 ($N = 1$); 66 ($N = 4$) and, 88 ($N = 7$). Clear discontinuities in the frequency distribution of fluorescence peak ratios allowed estimation of the ploidy levels of the individuals sampled by reference to an individual with both known chromosome number and flow cytometry assessment. *Fallopia aubertii* displayed a fluorescence peak ratio of 0.72 ($N = 2$) corresponding to diploid individuals with 20 chromosomes. The fluorescence peak ratios of the *F japonica* var. *compacta* ($N = 1$), tetraploid *F. x bohémica* ($N = 2$, from Cirencester) and *F. sachalinensis* ($N = 2$) were the same, suggesting that all those individuals are tetraploid ($2n = 44$). The peak ratios of the *F. japonica* var. *japonica* accessions ranged from 1.96 to 2.23 ($N = 35$), corresponding to reference octoploids ($2n = 88$). The ploidy levels of the individuals tentatively classified as *F. x bohémica* were more variable. Most of them exhibited a fluorescence peak ratio between 1.54 and 1.67 ($N = 26$), corresponding to reference hexaploids ($2n = 66$). One individual had a peak ratio of 1.38. It exhibited an aneuploid chromosome range from 44 to 67. Finally, three plants identified as *F. x bohémica* had peak ratios between 1.96 and 2.28 corresponding to the range observed for *F. japonica* var. *japonica*, and were octoploid $2n=88$.

2.3.2. RAPD variation

One hundred and thirty-four polymorphic RAPD markers were scored from the analysis of the eight primers on 87 individuals of *Fallopia*, 97.8 % of which were polymorphic (131 fragments). The monomorphic markers were removed from the analyses.

The level of genotypic diversity varied tremendously among the different putative taxa. All the octoploid individuals identified as *F. japonica* var. *japonica* ($N = 40$) shared the same multiband RAPD phenotype suggesting they belong to the same genetic clone. The same

situation was found for *F. aubertii* ($N = 6$). Two different RAPD phenotypes were found among the 6 *F. sachalinensis* individuals examined, one corresponding to male-sterile individuals ($N = 4$), the other to the male-fertile individuals ($N = 2$). In contrast, individuals identified as *F. x bohemica* exhibited a high genotypic diversity with 28 RAPD phenotypes out of 29 individuals for hexaploids, 3 RAPD phenotypes out of 3 individuals for octoploids, and 2 RAPD phenotypes out of 2 individuals for tetraploids. The minimum pairwise difference in band presence or absence between two individuals with different RAPD phenotypes was nine indicating that over interpretation of small differences was not the cause of this diversity. The two pairs of hexaploid *F. x bohemica* sharing the same RAPD phenotype grew close to each other.

The Bayesian analysis using Structure indicated the presence of four distinct genetic clusters in the sample of *Fallopia* (Figure 2.3). The likelihood of the data gradually increased from $K = 2$ ($\text{Ln} = -2705.2$) to a maximum at $K = 5$ ($\text{Ln} = -1419.9$). However, the highest value of $\Delta K = 749.4$ was observed at $K = 4$. Consequently and according to Evanno et al. (2005), the value of $K = 4$ was then retained and analysed for individual assignments. The individuals of *F. japonica* var. *japonica*, *F. aubertii*, and *F. sachalinensis* were all assigned to a single genetic cluster ($q_{\text{mean}} = 1.00$), which differed between taxa (Figure 2.4). The majority (17/29) of hexaploid *F. x bohemica* individuals were totally ($q_{\text{mean}} = 1.00$) assigned to a unique genetic cluster different from the parental species. The other hexaploid *F. x bohemica* individuals (including the aneuploid individual) (12/29) showed different degrees of admixture with the highest percentage of assignment to the group typical of *F. x bohemica* (q_{mean} ranging from 0.63 to 0.99), and various percentages of assignment to the cluster characteristic of *F. japonica* var. *japonica* (q_{mean} ranging from 0.01 to 0.37) and/or for a negligible proportion to cluster of *F. x sachalinensis* (q_{mean} ranging from 0.01 to 0.05).

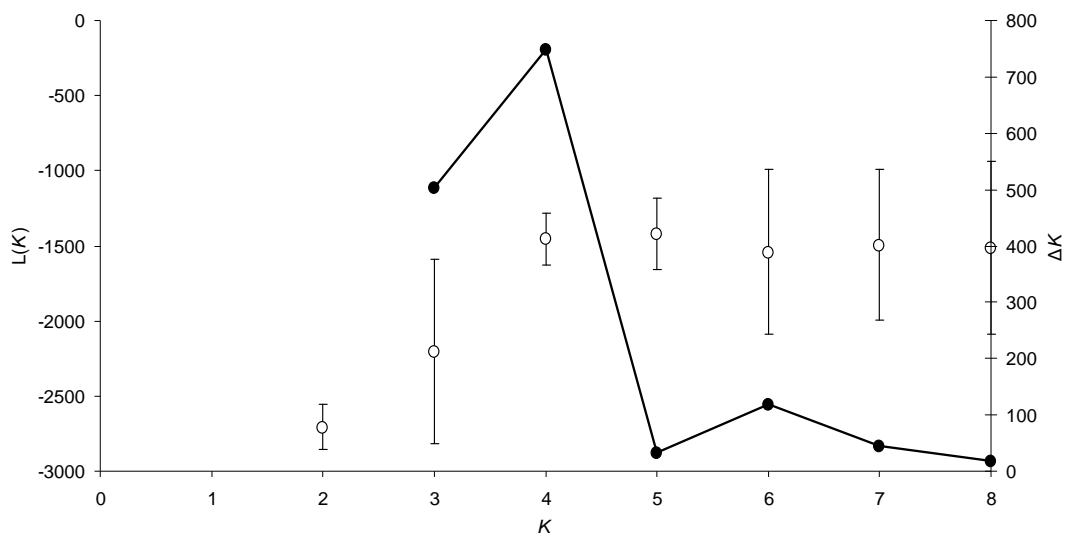


Fig. 2.3 Inference of genetic clusters (K) of *Fallopia* individuals using the model-based clustering method of Pritchard et al. (2000). Mean (\pm Standard Deviation) of log probability of data $L(K)$ based on four independent runs (\circ), as a function of the value of K and the rate of change in the log probability of data ΔK between successive value of K (\bullet) for the *Fallopia* dataset ($N = 87$).

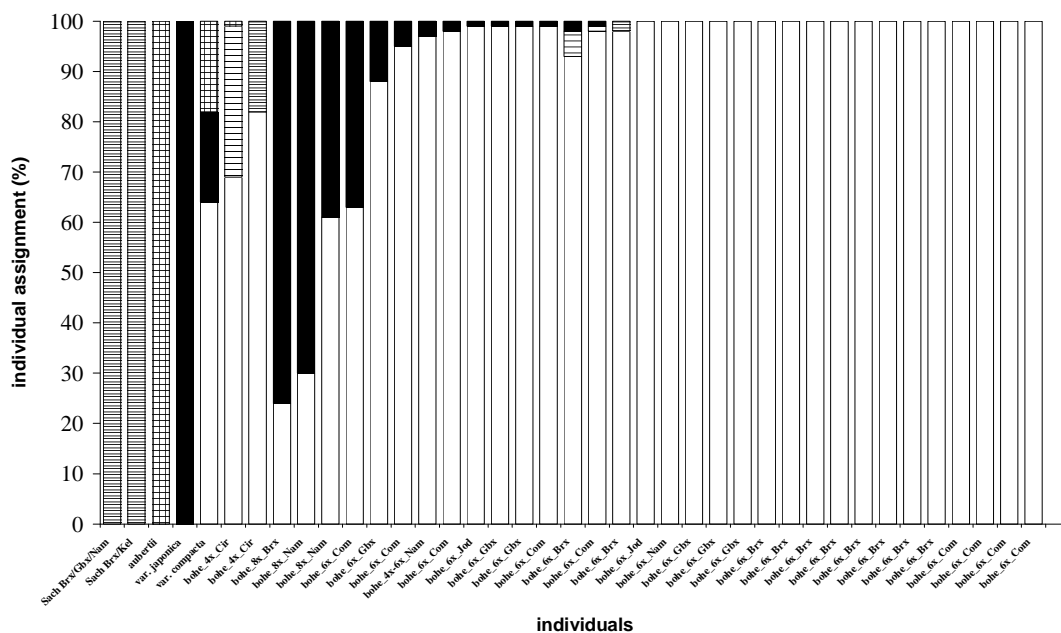


Fig. 2.4 Results of assignment test of the 87 individuals of *Fallopia* taxa sampled into four genetic clusters (K) detected using the model-based clustering method of Pritchard et al. (2000). Individuals exhibiting the same RAPD phenotype are represented only once. Hatched section represents *F. sachalinensis* ($N = 6$). Square section represents *F. aubertii* ($N = 6$). Black section represents *F. japonica* var. *japonica* ($N = 40$). White section represents *F. x bohemica* ($N = 35$) including the putative *F. japonica* var. *compacta*. Individuals are indicated by the first letters of the putative taxon, the ploidy level in the case of *F. x bohemica* and the locality code (Table 2.1).

The three octoploid individuals tentatively identified as *F. x bohémica* ($N = 3$) were admixed individuals with a more significant contribution of the genetic cluster characteristic of *F. japonica* var. *japonica* for two of them (q_{mean} ranging from 0.70 to 0.76) and a more significant contribution of the cluster typical of *F. x bohémica* for one of them ($q_{\text{mean}} = 0.61$). The two tetraploid *F. x bohémica* from Cirencester were also admixed individuals closer to hexaploid *F. x bohémica* but with a more significant contribution from the *F. sachalinensis* cluster than other hybrids ($q_{\text{mean}} = 0.18$ and 0.30). The putative *F. japonica* var. *compacta* ($N = 1$) was also an admixed individual assigned to three clusters with the main contribution from the cluster typical of *F. x bohémica* and similar contributions of the clusters of *F. japonica* var. *japonica* and *F. aubertii* ($q_{\text{mean}} = 0.18$ each). This suggests that this individual was erroneously identified as *F. japonica* var. *compacta* and was most probably a hybrid. The most parsimonious hypothesis on the origin of this hybrid, taking into account the results of flow cytometry and genetic assignment, is a crossing event between *F. aubertii* and an individual of *F. x bohémica*. Such a hybrid would exhibit 43 chromosomes. It is possible that flow cytometry results were erroneously interpreted as indicating 44 chromosomes due to the low difference.

The results of the principal coordinate analysis (PCO) of the individual genotypes were consistent with the results of the assignment test (Figure 2.5). The two principal axes explained 80.3 % of the total genetic variation. In the factorial space defined by the two first axes, there was no overlap between groups of different taxa. *Fallopia aubertii*, *F. japonica* var. *japonica*, and *F. sachalinensis* were clearly separated from the other groups, as well as tetraploid *F. x bohémica* from Cirencester, and the putative *F. japonica* var. *compacta* from Ceroux-Mousty. Hexaploid *F. x bohémica* accessions occupied an intermediate position between their putative parents but were closer to *F. japonica* var. *japonica*. This trend was even more pronounced for octoploid individuals tentatively identified as *F. x bohémica*.

In an attempt to clarify the relationships within the *F. x bohemica* complex, a separate PCO analysis was performed based on collection areas in Belgium, using a reduced RAPD data set (Figure 2.6). The proportion of variance explained by the first two axes was 49.2 %. Octoploid *F. x bohemica* tended to be isolated from hexaploid *F. x bohemica*. Hexaploid *F. x bohemica* individuals were little separated according to collection area.

The relative importance of *Fallopia* taxa in the studied area is depicted in Figure 2.1. It showed that 6x *F. x bohemica* was as widespread as *F. japonica* var. *japonica* in Belgium and that the relative abundance of these taxa varied strongly from one area to another. In Brussels for example, 6x *F. x bohemica* was the dominant form, but was totally absent in Ceroux-Mousty.

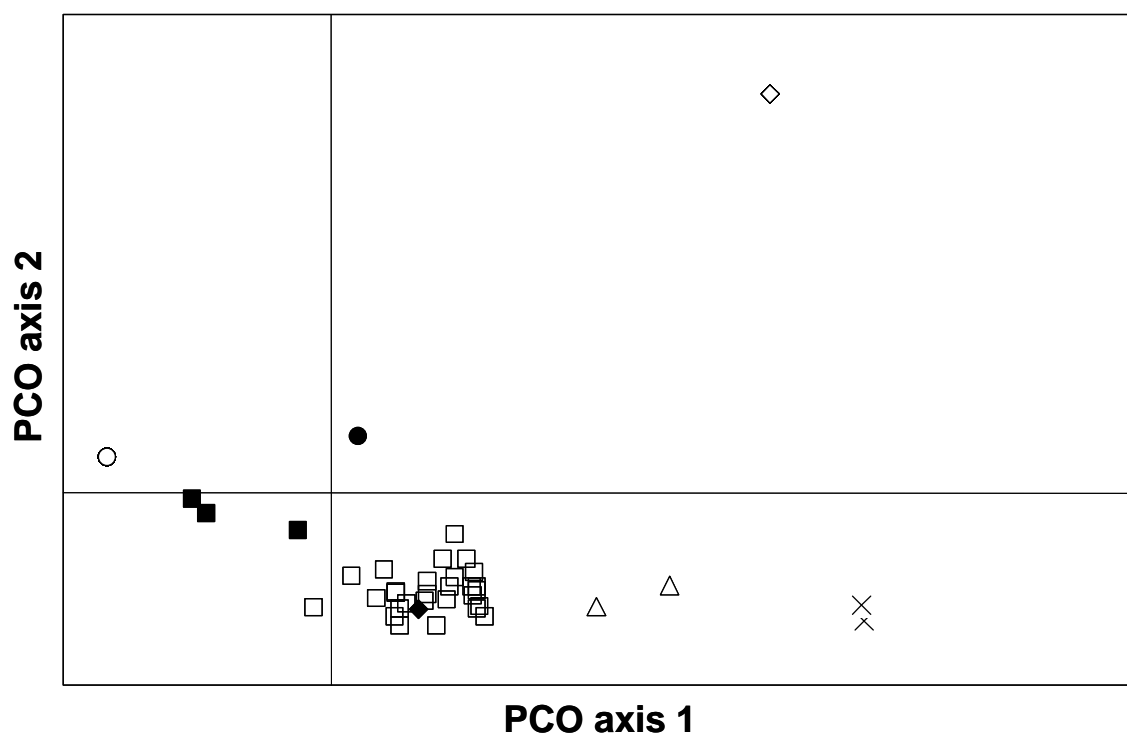


Fig. 2.5 Principal coordinate analysis (PCO) of the 87 individuals of *Fallopia* species sampled, based on 131 RAPD markers. The analysis was performed using a matrix of between-individual Dice similarities computed from the binary RAPD data and using GenAlex 6 program (Peakall and Smouse 2006). The first two axes accounted for 80.32 % of the total variation (axis 1: 52.89 %, axis 2: 27.44 %). (\diamond) *F. aubertii*; (Δ) *F. x bohemica* 4x; (\blacklozenge) *F. x bohemica* 4x – 6x; (\square) *F. x bohemica* 6x; (\blacksquare) *F. x bohemica* 8x; (\circ) *F. japonica* var. *japonica*; (\bullet) putative *F. japonica* var. *compacta*, (\times) *F. sachalinensis*.

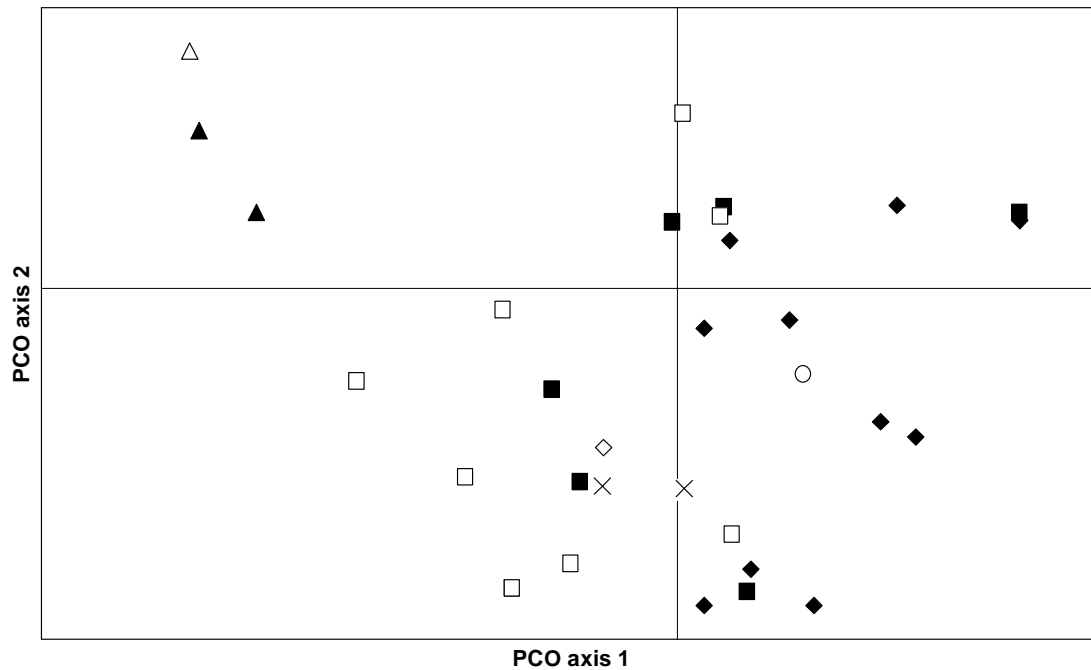


Fig. 2.6 Principal coordinate analysis (PCO) of the 34 individuals of *Fallopiya x bohemica* in relation to the sampled areas based on 131 RAPD markers. The analysis was performed using a matrix of between-individual Dice similarities computed from the binary RAPD data and using GenAlex 6 program (Peakall and Smouse 2006). The first two axes accounted for 49.2 % of the total variation (axis 1: 29.62 %, axis 2: 19.58 %). (+) *F. x bohemica* 4x Cirencester; (\diamond) *F. x bohemica* 4x – 6x Namur; (\blacklozenge) *F. x bohemica* 6x Brussels; (\square) *F. x bohemica* 6x Comblain-au-pont; (\blacksquare) *F. x bohemica* 6x Gembloux; (\times) *F. x bohemica* 6x Jodoigne; (\circ) *F. x bohemica* 6x Namur; (\blacktriangle) *F. x bohemica* 8x Namur; (\triangle) *F. x bohemica* 8x Brussels.

2.3.3. Morphological variation

In the PCA analysis of total morphological data, the three first axes extracted 81% of the variation. In this analysis, the hypothesized taxa corresponded fairly well to different parts of the variation pattern, with the exception of the octoploid putative *F. x bohemica* (Figure 2.7). As with the genetic data, the diploid *F. aubertii* and the tetraploid *F. sachalinensis* were well differentiated from other putative taxa. Hexaploid *F. x bohemica* and octoploid *F. japonica*

var. *japonica* formed a continuous pattern of variation but it was still possible to separate the two groups.

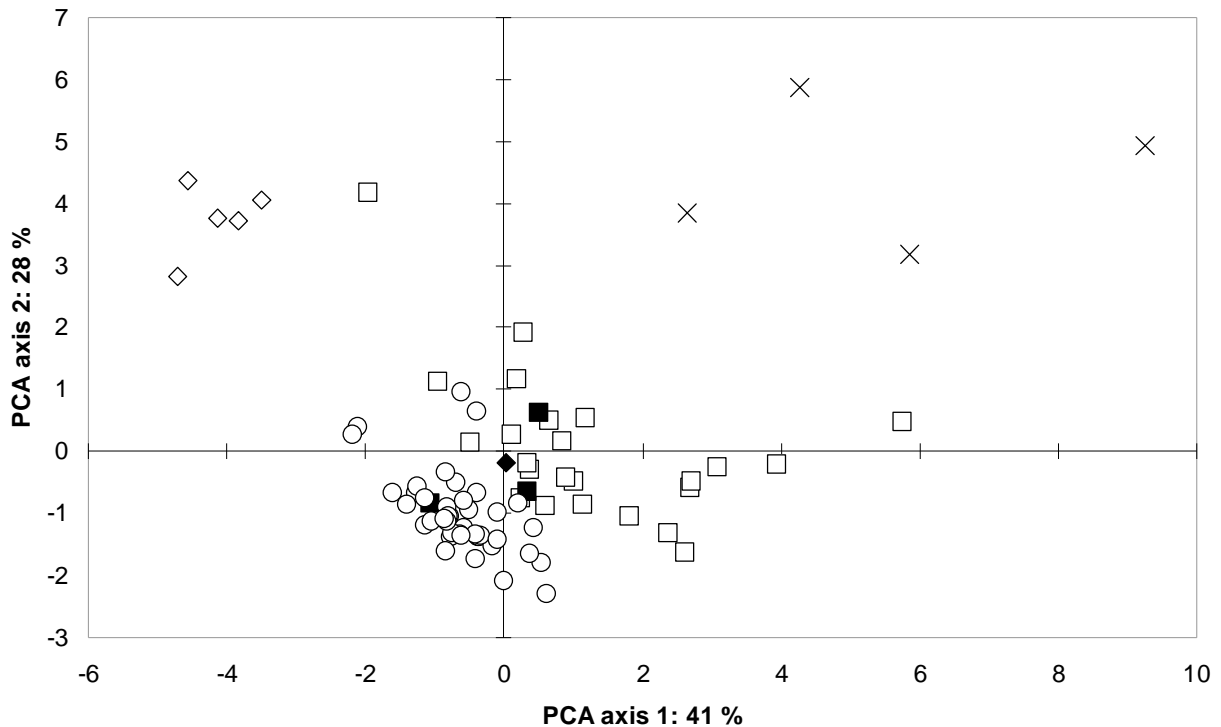


Fig. 2.7 Principal components analysis (PCA) of 79 individuals of *Fallopia* species sampled based on the mean measurements of 12 morphological characters and ratios. (\diamond) *F. aubertii*; (\blacklozenge) *F. x bohemica* 4x – 6x; (\square) *F. x bohemica* 6x; (\blacksquare) *F. x bohemica* 8x; (\circ) *F. japonica* var. *japonica*; (\times) *F. sachalinensis*.

Fallopia x bohemica was morphologically more similar to its octoploid parent *F. japonica* var. *japonica* than to its tetraploid parent *F. sachalinensis*. In contrast, the positions of the putative octoploid *F. x bohemica* were not fully in accordance with their earlier identification, since two of the three individuals were clearly more similar to *F. japonica* var. *japonica*. In spite of their lack of RAPD variation, *F. aubertii* and *F. japonica* var. *japonica* individuals exhibited significant morphological variation. The range of morphological variation of the hexaploid *F. x bohemica* was wider than its closer parent *F. japonica* var. *japonica*. Axis 1 was most strongly correlated with leaf length ($r = 0.96$), central width of leaf ($r = 0.93$) and

basal width of leaf ($r = 0.91$). Apex length, length of the cord, and the ratio cord length; leaf length, were most highly correlated with axis 2 ($r = -0.75$; 0.67 and 0.93 , respectively).

To identify characters that can readily discriminate between these taxa, we compared the mean values among the four main groups of individuals: diploid *F. aubertii*, tetraploid *F. sachalinensis*, hexaploid *F. x bohemica* and, octoploid *F. japonica* var. *japonica*. Putative octoploid *F. x bohemica* plants were excluded from the analysis due to the low number of samples. All the morphological characters used showed a significant difference, at least for one species, except for the ratio apex width; apex length (Table 2.2). The three characters best able to separate all species were: mean basal width of leaf (One-way ANOVA $F = 46.60$, $P < 0.0001$), mean central width of leaf (Kruskal-Wallis test $H = 32.34$, $P < 0.0001$), and mean length of leaf (Kruskal-Wallis test $H = 36.17$, $P < 0.0001$). Moreover, the cord length (One-way ANOVA $F = 53.80$, $P < 0.0001$), the ratio leaf basal width; leaf length (One-way ANOVA $F = 14.03$, $P < 0.0001$), and the ratio cord length; leaf length (One-way ANOVA $F = 61.90$, $P < 0.0001$) were useful in discriminating *F. japonica* var. *japonica* from 6x *F. x bohemica*. Hexaploid *F. x bohemica* invariably had short hairs on the back of the leaf, whereas *F. japonica* var. *japonica* had none.

2.4. Discussion

2.4.1. Hybridization pattern and genetic variation

Interspecific hybridization and polyploidization are recognized as a central feature for the evolution of the invasive alien knotweeds *Fallopia* spp. in their introduced range (Bailey, 2003). Thanks to their large geographic adventive range, *Fallopia* spp. provide an outstanding model to explore the diversity of patterns and mechanisms associated with hybridization. Our

study adds to the information available for the UK and the Czech Republic. Comparisons among regions across the adventive range of *Fallopia* will help to establish the role of hybridization and polyploidy in the invasive success of those taxa (Bailey and Wisskirchen 2006). In addition, as far as we are aware, our study represents the first assessment of the extent of the hybridization and differentiation of an invasive alien complex plant by using a combination of morphological and molecular approaches simultaneously.

Table 2.2 Mean measurements of 12 morphological characters and ratios of *Fallopia aubertii*, hexaploid *Fallopia x bohemica*, *Fallopia japonica* var. *japonica* and *Fallopia sachalinensis* sampled in Belgium. Standard deviations are given in brackets. The same superscript within a line indicates no significant difference between species. Comparisons between taxa were performed using the one-way ANOVA followed by the Tukey HSD post hoc test performed on \log_{10} -transformed measurements for hair length, stem diameter, leaf basal width, cord length, apex width, and performed on arcsine transformed measurements for the ratios cord length; leaf length, and leaf basal width; leaf length. We used the Kruskal-Wallis test followed by the non-parametric Mann-Whitney test for leaf central width, leaf length, apex length, the ratio apex width; apex length, and number of hairs.

Character	Species			
	<i>F. aubertii</i> (N = 6)	6x <i>F. x bohemica</i> (N = 28)	<i>F. japonica</i> var. <i>japonica</i> (N = 41)	<i>F. sachalinensis</i> (N = 4)
Stem diameter (mm)	2.33 (1.13) ^a	22.81 (4.58) ^b	19.55 (4.94) ^b	21.38 (2.42) ^b
Number of hairs	0.00 (0.00) ^a	20.49 (16.20) ^b	0.00 (0.00) ^a	21.58 (10.18) ^b
Hair length (mm)	0.00 (0.00) ^a	0.66 (0.40) ^b	0.00 (0.00) ^a	3.05 (0.53) ^c
Leaf basal width (mm)	23.24 (4.80) ^a	81.82 (25.97) ^b	63.76 (14.33) ^c	148.46 (68.75) ^d
Leaf central width (mm)	28.05 (5.34) ^a	112.65 (29.40) ^b	95.22 (13.07) ^c	153.33 (34.62) ^d
Leaf length (mm)	48.91 (9.39) ^a	161.97 (42.17) ^b	127.44 (16.16) ^c	247.35 (59.48) ^d
Cord length (mm)	3.47 (1.59) ^a	3.18 (2.61) ^a	0.39 (1.05) ^b	21.51 (8.49) ^c
Apex length (mm)	4.53 (1.55) ^a	14.29 (4.47) ^b	14.69 (3.17) ^b	10.50 (5.67) ^{a,b}
Apex width (mm)	4.12 (0.87) ^a	13.17 (2.84) ^b	12.89 (2.17) ^b	12.79 (3.07) ^b
Cord length; leaf length	0.07 (0.02) ^a	0.02 (0.02) ^b	0.00 (0.01) ^c	0.09 (0.02) ^a
Leaf basal width; leaf length	0.58 (0.05) ^a	0.70 (0.08) ^b	0.75 (0.06) ^c	0.62 (0.07) ^{a,b}
Apex width; apex length	0.99 (0.29) ^a	1.04 (0.55) ^a	0.91 (0.20) ^a	1.47 (0.67) ^a

We confirm that at least four taxa with different ploidy levels take part in this pattern of invasion in Belgium: *F. aubertii* (diploid), *F. sachalinensis* (tetraploid), *F. japonica* var. *japonica* (octoploid), and the hybrid *F. x bohemica* (various chromosome numbers, the 6x

being the most frequent). The taxonomic status of the individual identified as *F. japonica* var. *compacta* was not confirmed based on assignment tests with RAPD data. Our results demonstrate a pattern of interspecific hybridization among the *Fallopia* taxa in Belgium, which in the case of *F. x bohemica* provided increased levels of variation compared with the parental taxa.

The three putative parental taxa for whose presence we confirmed in Belgium (*F. japonica* var. *japonica*, *F. sachalinensis*, *F. aubertii*) all exhibit a low level of genetic diversity. All individuals of *F. japonica* var. *japonica* share the same multilocus genotype, indicating a high level of clonality. They nonetheless exhibit a wide range of morphological variation. These results are consistent with the pattern reported from Great Britain and the Czech Republic (Hollingsworth et al. 1998, Hollingsworth and Bailey 2000b, Mandák et al. 2005) and demonstrate that the morphological variation observed in this species is caused by plastic responses to local environments or by a somewhat insignificant genetic variation at a small number of loci. The coefficients of variation of the morphological characters (*CV*) are between 8 % and 268 % (data not shown). The character that has greatest variability (*CV* = 268 %) is the length of the cord (measured from the base of the leaf to the top insertion of the petiole), the ratio leaf basal width; leaf length is the character that presents a morphological variation much less significant (*CV* = 8 %). This is the first assessment of the genotypic diversity of the introduced *Fallopia aubertii*. The species has a single multilocus genotype probably resulting from clonal multiplication by horticulturists. In its native range, *F. sachalinensis* has high genotypic diversity (Pashley et al. 2007). In contrast, genotypic diversity of the taxon is known to be lower in the adventive range (Pashley et al. 2007), but with variation from one region to the other, British *F. sachalinensis* displaying less genotypic diversity than the Czech ones, for example. In our study, *F. sachalinensis* exhibits a low genotypic diversity with two genotypes found in the six plants sampled. It may be argued that

this low genetic diversity is the result of the small sample size of *F. sachalinensis*. Nevertheless, as we sampled all the individuals of *F. sachalinensis* in the area, it reflects the current situation of the species in Belgium. Two of the six *F. sachalinensis* examined were male-fertile and corresponded to one of the two genotypes detected. This is similar to the situation in the UK where *F. sachalinensis* mainly belongs to two widespread genotypes, one male-fertile and one male-sterile clone (Pashley et al. 2007) and points to the role of vegetative propagation in the expansion of *F. sachalinensis* in Belgium.

In contrast to parental species, hybrids found in Belgium have much higher levels of genetic diversity and a complex pattern of admixture between different gene pools. Using assignment tests with no prior information on RAPD data, we demonstrate that hybrid genotypes are mainly assigned to a specific genetic pool and not to a mixture between the genetic pools of the putative parents as would be expected for hybrids. At least two hypotheses may explain this pattern. First, hybrids may be introduced independently of the parental species in their introduction range. In this case, the initial pool of hybrids may have carried its own genetic diversity. Second, recent studies show that polyploid genome evolution appears often to be accompanied by rapid structural changes (Ozkan et al. 2001, Salmon et al. 2005) resulting in the case of dominant markers in parental fragment loss or in new fragment addition (Salmon et al. 2005). In our study, the analysis of RAPD data shows that 16% of RAPD phenotype bands found in the hybrids are hybrid-specific.

Hexaploid *F. x bohémica*, which was the most widespread hybrid in our study, exhibits a higher level of genotypic diversity (28 genotypes from 30 plants) than that reported in the Czech Republic (33/88, one dominant genotype, based on isozymes, Mandák et al. 2005) or along river basins in the UK (Hollingsworth et al., 1998; Hollingsworth and Bailey, 2000). This difference with the Czech data possibly arises from the use of molecular markers with different levels of polymorphism, RAPDs exhibiting higher polymorphism than isozymes.

The differences from the UK situation may stem from differences in the balance between sexual and vegetative reproduction in different sites. Populations along river basins (UK) may be more prone to dispersal by water transport of vegetative fragments following disturbance, while colonization of new sites in 'non river' systems would rely on long distance dispersal of seeds that is shown to be possible in *F. japonica* var. *japonica* (Tiébré et al., 2007).

The high genotypic diversity in hexaploid *F. x bohemica* may stem from different sources: 1) multiple in situ hybridization between parental taxa, 2) consequences of the male fertility of the hybrids (Tiébré et al., 2007) resulting in hybrid sexual reproduction or backcross with the parental species, 3) multiple introduction by human activities. The relative importance of these different factors is subject to debate (Hollingsworth and Bailey 2000b, Pashley et al. 2003, Mandák et al. 2005) and our results give additional insights. Multiple in situ F1 production is not supported by the results of the assignment tests. In addition, it would require the presence of both parents including male-fertile *F. sachalinensis*. In two of the areas studied (Gembloux and Comblain-au-pont) we made exhaustive surveys of all *Fallopia* present and in other areas searched intensively for *F. sachalinensis*. In two of the areas where *F. x bohemica* occurs, we did not find any *F. sachalinensis* and in the three areas where *F. sachalinensis* occurs (albeit at low frequency) none were male-fertile. Although we cannot rule out the possibility that male-fertile stands previously occurred in the areas or their surroundings, the pattern of distribution of *F. sachalinensis* makes it unlikely that multiple in situ hybridization events are the main source of the genotypic variation of hexaploid *F. x bohemica*. In addition to the possibility of multiple introductions, restoration of sexual reproduction in the complex as demonstrated by Tiébré et al. (2007) is the most likely explanation for the high genetic diversity. In a previous study (Tiébré et al 2007), we demonstrated that seeds borne on *F. japonica* var. *japonica* exhibited a large range of ploidy

levels resulting most probably from crossing with *F. aubertii* and backcrosses with more or less unreduced gametes from *F. x bohémica*.

It is not impossible that such backcrosses produce hexaploid hybrids, as irregular meiosis in *F. x bohémica* can give rise to gametes with a wide range of chromosome numbers. Alternatively, cross fertilisation between F1 (or following generations) hybrids may also give rise to $2n = 66$ individuals. One argument sustaining the possibility of backcross with parental species or inter-hybrid fertility is the fact that we found one adult hybrid with an aneuploid chromosome number (44-67) that most probably results from a cross with *F. japonica* var. *japonica*. Besides, we also found that the tetraploid individual, presumably identified as *F. japonica* var. *compacta*, was in fact most probably a hybrid between *F. x bohémica* and *F. aubertii*. This confirms that *F. aubertii* may play a role in the pattern of hybridization in the *Fallopia* complex. Nevertheless, considering the existing evidence on variation of ploidy level in *F. japonica* var. *japonica* seeds (Tiébré et al. 2007), we should consider that the predominance of hexaploid hybrids in adult populations collected in the same areas is the result of a differential selection for $2n = 66$ progeny from cytological variable arrays as suggested by Mandák et al. (2005).

The tetraploid *F. x bohémica* is formed by crosses between *F. japonica* var. *compacta* and *F. sachalinensis* (Mandák et al. 2003, Bailey and Wisskirchen 2006). As expected, the Bayesian-based cluster analysis and the PCO analysis of RAPD data showed that the 4x *F. x bohémica* from Cirencester (UK) were genetically closer to *F. sachalinensis*. Unfortunately as we did not find tetraploid *F. japonica* var. *compacta* in Belgium, we cannot comment further on the origin of the 4x hybrid.

The presence of octoploid *F. x bohémica* with different genotypes to *F. japonica* var. *japonica* is more puzzling. These individuals have a number of possible origins (Bailey and Wisskirchen 2006). The first scenario is the fusion of an unreduced male gamete from

hexaploid *F. x bohémica* and normal gametes from tetraploid *F. sachalinensis* (the reverse being unlikely as generally no male-fertile *F. sachalinensis* was present in areas). This hypothesis is not supported by the Bayesian-based cluster analysis and the PCO analysis of RAPD data, as it would result in an equal contribution of *F. japonica* var. *japonica* and *F. sachalinensis* chromosomes in the hybrid (44 each). In situ autopolyploidy of tetraploid *F. x bohémica* (Mandák et al. 2003) is also unlikely as we did not detect this cytotype in the areas studied in Belgium. Because two of these clones are morphologically very close to *F. japonica* var. *japonica*, one may ask whether they are actually genetic variants of the widespread *F. japonica* var. *japonica* clone. Whilst these two accessions differed from *F. japonica* var. *japonica* only by the absence of a few specific bands, they were also assigned for a significant proportion to the genetic cluster typical of *F. x bohémica*, attesting to their hybrid origin.

Whatever its source, increased genetic variability may be important for the invasive success of the hybrid *F. x bohémica* as suggested by Pyšek et al (2003) in the Czech republic. *Fallopia x bohémica* has always been considered as rare in Belgium, even in the most recent Flora, and is only described as a hybrid of horticultural origin (Lambinon et al. 2004). However, our investigations indicate that *F. x bohémica* is widespread in Belgium and its distribution varies between regions. This inconsistency may be due to the inability of authors to distinguish *F. japonica* var. *japonica* and *F. x bohémica* on morphological grounds. Alternatively, it may represent a recent expansion of *F. x bohémica*, not yet recorded in the Belgian floristic database, indicating an increase in the invasive success of the hybrid relative to that of its parents.

There was no clear regionalization of *F. x bohémica* clones based on spatial distribution. This absence of regionalization may be due to a common pool of parental species at the initiation of the hybridization process and to extensive gene flow between fertile hybrids as suggested

above or to an insufficient time for hybrid populations to differentiate under isolation by distance. A widespread survey of the genetic variability of *F. x bohemica* individuals in west continental Europe would be informative to assess the full extent of genetic differentiation in this complex.

2.4.2. *Morphological characters for distinguishing all taxa of the alien Fallopia complex*

In examining the distribution of *Fallopia* hybrids at the European scale, Bailey and Wisskirchen (2006) point to large areas without known occurrence. They argued that this situation may result from differential evolution depending on the regions or from misidentification by field botanists despite keys for identification of hybrids and parental *Fallopia* taxa being available in few modern floras and sometimes in the form of synoptic tables in journals (Fojcik and Tokarska-Guzik 2000, Kim and Park 2000, Zika and Jacobson 2003). This points to the importance of reliable characters for distinguishing the different taxa in the invasive *Fallopia* complex.

In this study, we use the morphological characters most often used in the literature for identification of *Fallopia* species (Barral 1994, Beerling et al. 1994, Jager 1994, Lambinon et al. 2004). In order to buffer plasticity due to variation in environment, we use the mean measurements of three basal leaves and three stems per individual. The statistical analyses indicate several characters that could be used to distinguish between the *Fallopia* taxa and their hybrids. The most reliable characters are the leaf size: mean basal width, mean central width, and mean length, which clearly separated all taxa. *Fallopia sachalinensis* is most distinguished by its larger ovate leaf, its cordate base, and its dense long hairs. *Fallopia aubertii* is clearly different from the other taxa with its smaller leaves; mean leaf length no

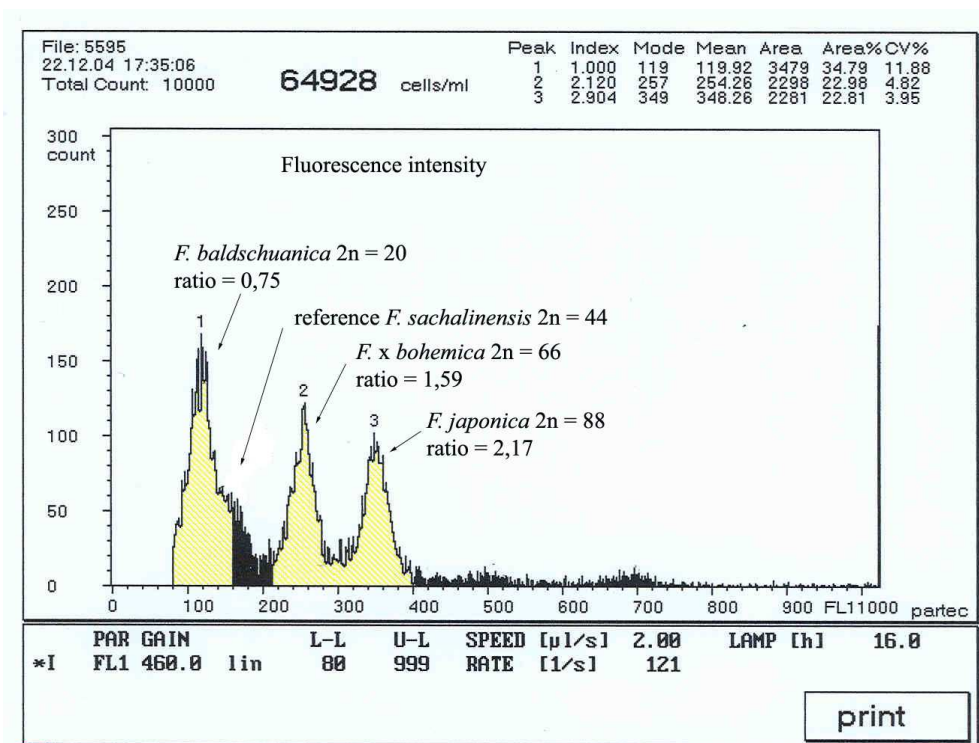
more than 5 cm, and its climbing habit. Hexaploid *F. x bohémica* are morphologically very close to *F. japonica* var. *japonica*. However, the presence of hairs and a somewhat cordate leaf in *F. x bohémica* is sufficient to discriminate them from *F. japonica* var. *japonica*. Our results are in agreement with the studies conducted on the morphological and chromosomal variation of the alien *Fallopia* species in Korea, Poland, and North America (Fojcik and Tokarska-Guzik 2000, Kim and Park 2000, Zika and Jacobson 2003). The case of the octoploid *F. x bohémica* plants that could not be distinguished from *F. japonica* var. *japonica* on morphological grounds, points to the value of molecular studies in the assessment of the extent of hybridization in species complexes.

2.5. Conclusions

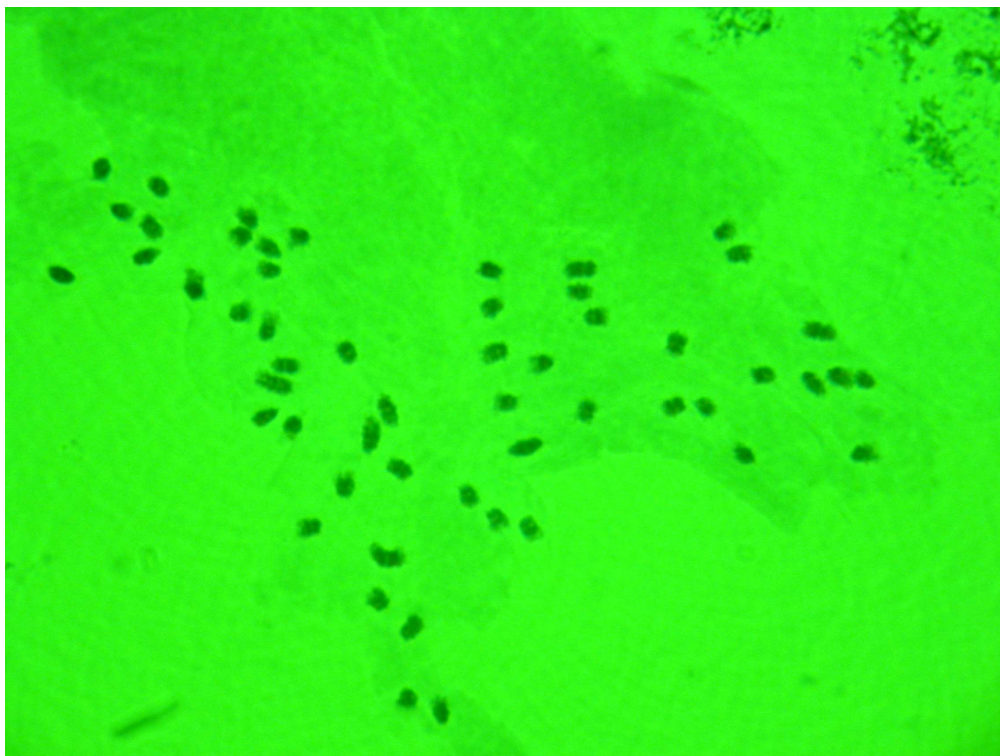
Clonal growth is claimed to be the major mode of reproduction of *Fallopia* species in their introduced range (Beerling et al. 1994, Child and Wade 2000, Weber 2003). Accordingly, *Fallopia* taxa should be characterized by a low genotypic diversity. The high level of genotypic diversity observed in the present study in the hybrid *F. x bohémica* as compared to the parental species confirms the occurrence of interspecific hybridization among the *Fallopia* taxa in Belgium and the restoration of the sexual reproduction by hybridization in the invasive alien *Fallopia* complex. This may increase the potential of the taxa to adapt and differentiate into new environments and contribute to the dramatic invasive success of knotweeds in their adventive range. A complete study of the hybridization status is essential in the European context, using a combination of morphological and molecular approach. In our study of the situation in Belgium, we have defined valuable identification criteria that could be used to study the extent of hybridization on the European scale. Our results point to the importance of

hybridization and polyploidization in increasing the genetic diversity and potential invasion success of exotic alien taxa.

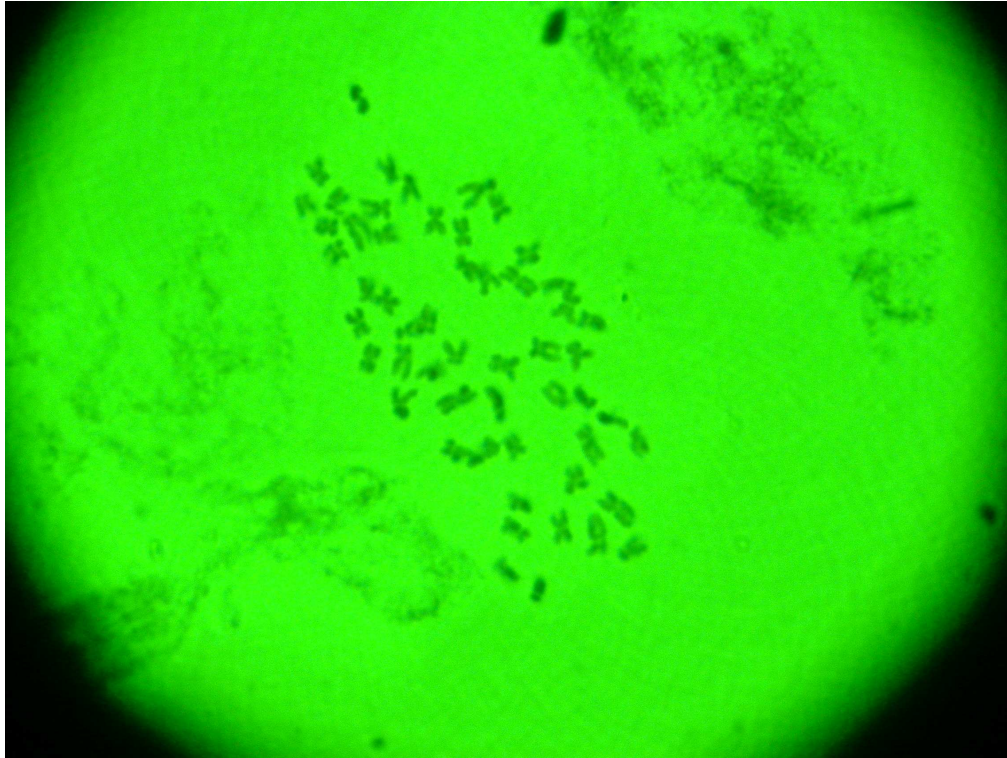
Annexes



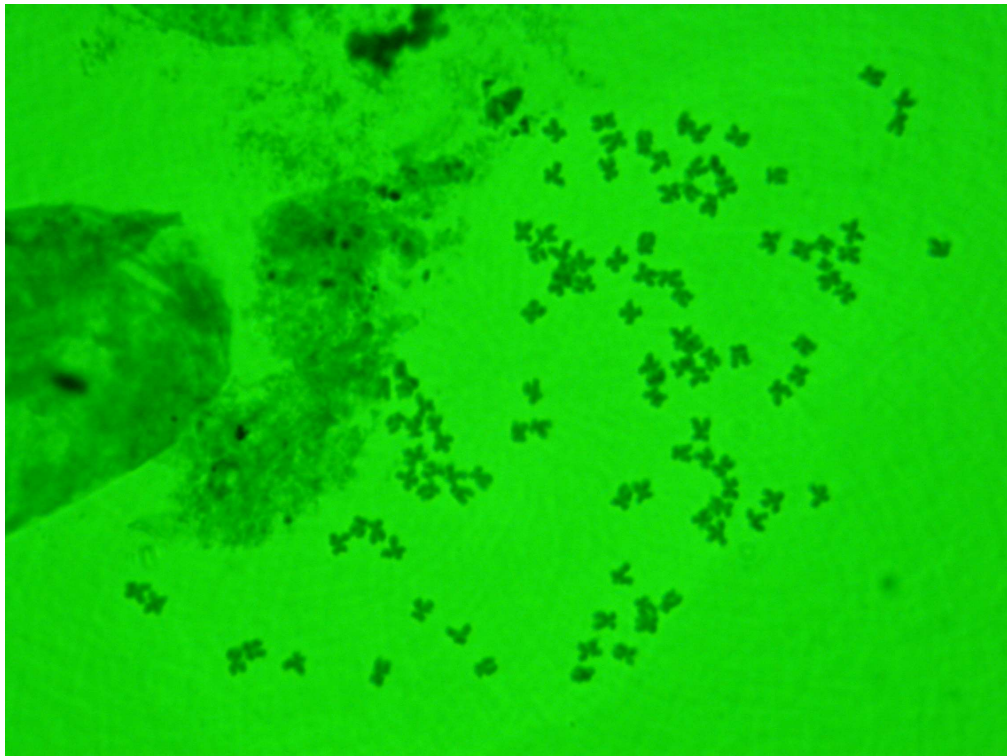
Annexe 2.1 Distribution des pics d'intensité de fluorescence de *Fallopiya aubertii* (Syn. *Fallopiya baldschuanica*), *Fallopiya sachalinensis*, *Fallopiya japonica* et l'hybride *Fallopiya x bohemica* en cytométrie de flux.



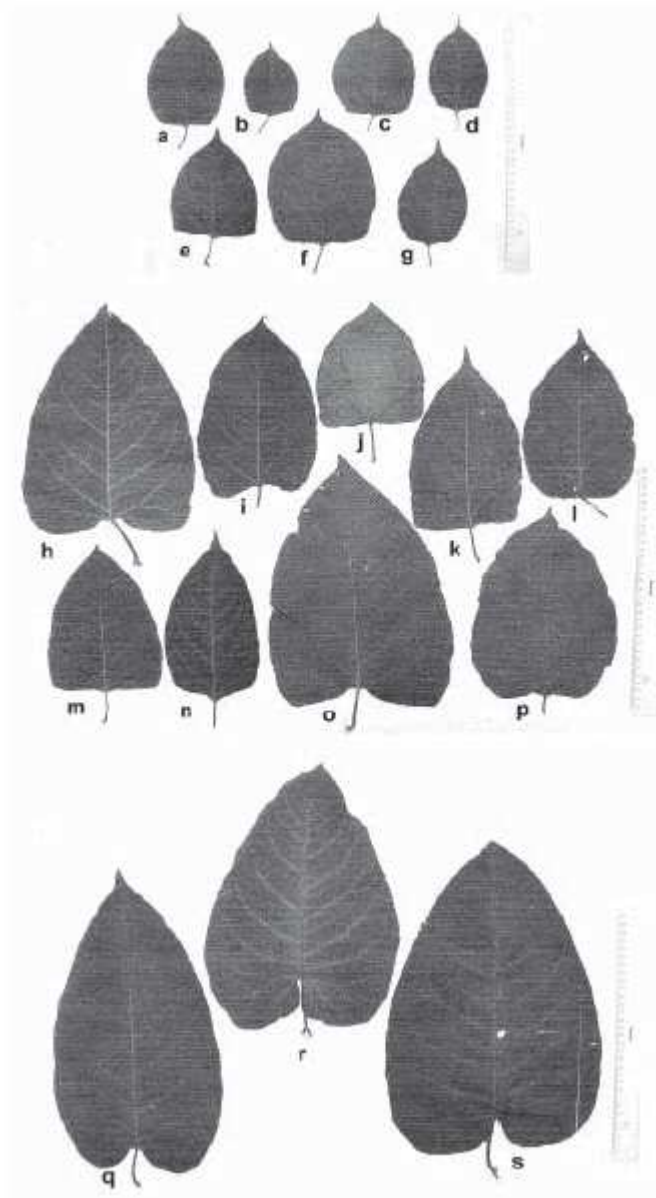
Annexe 2.2 Les chromosomes d'une plantule *Fallopiya x conollyana* (2n = 54) issue de la germination d'une graine prélevée sur *Fallopiya japonica*.



Annexe 2.3 Les chromosomes différenciés d'une plantule *Fallopia x conollyana* ($2n = 54$) issue de la germination d'une graine prélevée sur *Fallopia japonica*.



Annexe 2.4 Les chromosomes d'une plantule aneuploïde *Fallopia x bohemica* ($2n = 110$) issue de la germination d'une graine prélevée sur *Fallopia japonica*.



Annexe 2.5 La variation dans la forme des feuilles de : a-g (*Fallopia japonica*), h-p (*Fallopia x bohemica*), q-s (*Fallopia sachalinensis*) (Bailey and Wisskirchen 2006).

Chapter 3: Hybridization and sexual reproduction in the invasive alien *Fallopia Adans.* (Polygonaceae) complex in Belgium¹

Abstract. The knotweed complex, *Fallopia* spp. (Polygonaceae), belongs to the most troublesome invasive species in Europe and North America. Vegetative regeneration is widely recognized as the main mode of reproduction in the adventive regions. However, the contribution of sexual reproduction to the success of these invasive species has only been detailed for the British Isles. We examined how hybridization may influence the sexual reproduction of the complex in Belgium and determine how it may contribute to the dispersal of the species. We followed floral biology, reproductive success, seed rain, seed bank, germination capacity, seedling survival, and dispersal capacity in order to characterize the reproductive biology of the species. Moreover, chromosome counts and flow cytometry were used to assess the hybrid status of seedlings produced by sexual reproduction. In the investigated area, we demonstrated extensive sexual reproduction by hybridization within the complex, including one horticultural species. A small percentage of seeds may be dispersed outside the maternal clone (> 16m) allowing the formation of genetically differentiated individuals. Seed germination was possible even after a winter cold period. The extensive sexual reproduction by hybridization could further contribute to the dramatic invasive success of knotweeds in Belgium and should not be underestimated when considering control and management measures.

Key words: Chromosome counts, dispersal capacity, *Fallopia aubertii*, *Fallopia x bohemica*, *Fallopia japonica*, *Fallopia sachalinensis*, flow cytometry, germination, hybridisation, invasive plant, sexual reproduction.

¹ Marie-Solange Tiébré, Sonia Vanderhoeven, Layla Saad and Grégory Mahy. 2007. *Annals of Botany*, 99: 193-203.

3.1. Introduction

Reproductive strategy is a central feature of the ecology of invasive species as it determines the potential for range expansion (Daehler and Strong 1994, 1996, Rejmánek and Richardson 1996, Pyšek 1997, Grotkopp et al. 2002). Sexual reproduction, high levels of fecundity and strong vegetative regeneration are some of the characteristics most frequently cited when compiling criteria promoting plant invasion (Baker 1974, Noble 1989, Rejmánek 1995, Crawley et al. 1996). As mostly perennial plants, invasive species are able to reproduce sexually through seed production and/or clonally through vegetative propagation. The advantages of the clonal propagation are a rapid and almost unlimited propagation of combinations of favourable genes, a possibility for sterile genotypes to increase, a potential to colonise rapidly favourable habitats, a lifespan potentially unlimited, and a repartition of clone extinction risks (Silander 1985). Sexual reproduction has the advantage of generating genotypic diversity, increasing the ability of species to adapt to adventive environments. Moreover, thanks to various dispersal mechanisms, seed production will extensively contribute to long-distance dispersal, which will also determine the expansion of species (Levin 2000). The trade-off between 'reproductive' vs 'vegetative' strategies is thus a crucial determinant of successful invasion (Eckert et al. 2003, Brown and Eckert 2005, Lui et al. 2005). Furthermore, interspecific hybridization with aliens has often stimulated the evolution of new and sometimes invasive species (Abbott 1992) and the increase in human activities has provided new occasions for interspecific hybridization and the formation of new niches that better suit the hybrids than the parents (Vilà et al. 2000). Because of the swiftness of the evolutionary processes involved, invasions are excellent opportunities to study short-term evolution of species (Allendorf and Lundquist 2003).

Belgium and its neighbours have suffered from invasion by exotic plants that have dramatically increased their range in the last 30 years (Muller 2000, Verloove 2002). Knotweeds, *Fallopia* spp., are among the most troublesome invaders in this area (Godefroid 1996, Verloove 2002) and more generally in Europe and Northern America (Weber 2003), enhancing nutrient cycling rates and topsoil fertility and decreasing the plant species diversity of invaded sites (Vanderhoeven et al. 2005). Originally from Asia (China, Japan, parts of Korea and Taiwan) and introduced in Europe in mid 1800's as ornamental plants and fodder (Bailey and Conolly 2000), knotweeds are now widely naturalized (Godefroid 1996, Fojeik and Tokarska-Guzik 2000, Hollingsworth and Bailey 2000b, a, Forman and Kesseli 2003, Mandák et al. 2003). These plants thrive in various habitats including riparian ecosystems, and disturbed areas such as roadsides and waste places (Weber 2003).

Hybridization processes have often been described within *Fallopia* spp. A basic scheme of the relationship between the different taxa of the genus has been drawn in the British Isles based on molecular markers (RAPDs and ISSR) and chromosome counts (Bailey and Stace 1992, Bailey et al. 1995, Hollingsworth et al. 1998, Hollingsworth and Bailey 2000a, Pashley et al. 2003), and in the Czech Republic, based on isozymes and flow cytometry analyses (Mandák et al. 2003, Pyšek et al. 2003). The following species and hybrids have been described: *F. japonica* (octoploid, $2n = 88$); *F. sachalinensis* (tetraploid, $2n = 44$), less widespread than *F. japonica*; *F. x bohémica*, with varying ploidy level from tetraploid to octoploid (Bailey 2003a, Bímová et al. 2003), an apparent result of hybridization between the first two taxa and of the resulting backcrosses and which seems to be more invasive compared to its parents; *F. japonica* var. *compacta*, tetraploid and rare, and *F. aubertii* (Syn. *F. baldschuanica*), diploid, rare in the nature but nowadays commonly cultivated. The hybrid between *F. japonica* and *F. aubertii* has been reported as *F. x conollyana* but up to now, only a minute proportion has ever germinated and become established in nature (Bailey 2001).

In their native range where they occur in open habitats for instance as pioneer species of volcanic ash (Schnitzler and Muller 1998, Bailey 2003a), *F. japonica* and *F. sachalinensis* both reproduce by sexual reproduction, with hermaphrodite and male-sterile stands (Tanaka 1966), and by vegetative regeneration (Maruta 1976). On the other hand, in the British Isles, every plant of *F. japonica* (referred to as var. *japonica*) examined by Bailey (1994) was male-sterile, characterized by small, included anthers, implying that all reproduction is by vegetative spread (Hollingsworth and Bailey 2000b) No pure-bred seed has been found on British plants of *F. japonica* (Beerling et al. 1994). Because *F. sachalinensis* occurs as both hermaphrodite and male-sterile plants, pure-bred seeds are formed and reproduction can both occur sexually and asexually (Bailey, 1994). The hybrid *F. x bohémica* has both male-sterile and hermaphrodite individuals with partial to full fertility (Bailey et al., 1996). Since only one female clone of Japanese knotweed is found in Britain, it is unable to reproduce itself, and any seed found on these plants is the result of pollination by a related species. It has also been found (Bailey, 1989) that the hermaphrodite plants of *F. sachalinensis* and *F. x bohémica* are self-incompatible, that is, they are unable to form seed without an additional source of pollen. Up to now, the reproductive biology and the fertility of the invasive *Fallopia* spp. have only been assessed from a quantitative point of view in the UK (Bailey, 1994) and through germination experiments and seedling monitoring in Northern America (Forman and Kesseli, 2003). In west continental Europe, particularly, data concerning the sexual status of the species and their ability to hybridise are lacking (Lambinon et al., 2004).

Invasive *Fallopia* species are extremely difficult to control by both manual and chemical methods (Weber, 2003). The combination of a huge vegetative propagation (Bímová et al., 2003), hybridization and polyploidization, high competitive capacity, and potential outcrossing greatly contribute to the worrying success of these invasive species (Child and Wade 2000, Hathaway 2000, Child et al. 2001, Mandak et al. 2004).

The aim of the present study was to examine how hybridization may influence the sexual reproduction of *Fallopia* species in Belgium and to determine how it may contribute to their invasive success. We followed different components of the reproductive biology including: (1) floral biology; (2) reproductive success; (3) seed rain; (4) seed bank; (5) germination capacity, (6) seedling survival and (7) dispersal capacity. Moreover, the hybrid status of seedlings produced by sexual reproduction was assessed by mitotic root tip chromosome counts and flow cytometry.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Floral structure

Fallopia spp. are characterized by five tepaled perianth with a trigonous gynoecium, short style, and trifid fimbriate stigma surrounded by eight anthers. In male sterile plants, the anthers are small, flattened, empty, and included within the perianth, whereas the male-fertile flowers have large full anthers well exerted from the perianth, displaying varying degrees of stigmatic development (Bailey, 1989).

3.2.2. Study area

In Belgium, the four following exotic species have been described within the genus: three erect rhizomatous perennials *F. japonica* (Houtt.) Ronse Decraene, *F. sachalinensis* (F. Schmidt Petrop.) Ronse Decraene, and *F. x bohemica* (Chrtek et Chrtková) J.P. Bailey and one climbing perennial, *F. aubertii* (L. Henry) (Syn. *F. baldschuanica* (Regel) Holub) (Holub 1970, Haraldson 1978, Bailey and Stace 1992, Bailey 1994, Beerling et al. 1994, Bailey 2001,

Lambinon et al. 2004). *F. x bohemica*, as mentioned above, is a hybrid between *F. japonica* and *F. sachalinensis* and of the resulting backcrosses with the parent species. *Fallopia japonica* var. *compacta* (Hook. F.) J.P. Bailey is much rarer.

Four sites were selected in Belgium. The different species were distinguished in the field according to morphological vegetative characters reported in the literature (Barral 1994, Beerling et al. 1994, Jager 1994, Anonyme 2001, Lambinon et al. 2004). The main study site was a semi-rural landscape (1300 hct) in the vicinity of Gembloux (50°33'N; 4°41'E) where a complete landscape survey was performed in 2002 and 2003 to identify all clones of *F. japonica*, *F. sachalinensis*, *F. x bohemica* and *F. aubertii*. Additional clones of *F. japonica* and *F. x bohemica* were also selected in the neighbourhood of Namur (50°27' N; 4°51' E). As *F. sachalinensis* is not widespread in Belgium, the study area was extended to the region of Brussels (50°50' N; 4°21' E). Additionally, one hermaphrodite clone of *F. sachalinensis* was selected in Kelmis (50°43' N; 6°00' E).

3.2.3. *Floral biology*

Flower buds and flowers were collected from *Fallopia* clones, stored in ethyl alcohol (70%) until examination. The morphology of two flowers per clone (development of stamen, stigma and ovary) was observed using a binocular microscope (Nikon Japan SMZ-10A) on 20 clones of *F. japonica*, 5 *F. x bohemica* and 6 *F. sachalinensis* clones in the summer of 2002, and 7 *F. aubertii* clones in the summer of 2004. The diameter of the corolla was measured at 10X lens. The ovary was dissected and the length and width of the ovule measured at 25X. The number of pollen grains per flower was assessed. Buds were acetolysed in 50 µL of a mixture of 8:1 acetic anhydride–H₂SO₄ and the number of pollen grains counted under a microscope (Nikon Japan Labophot-2) at 100X. Mature stamens were crushed in a drop of lactophenol

cotton blue on a microscope slide and the pollen examined at 100X. Pollen was considered viable and potentially fertile if it appeared normal in shape and if the cytoplasm was stained dark blue (Jacquemart and Thompson 1996). The percentage of viable pollen grains was calculated on the basis of 100 observations when sufficient pollen grains were present.

3.2.4. *Pollination and reproductive success*

To assess pollination success, the number of pollen grains deposited on stigmas of three open pollinated flowers per clone was estimated in fall 2002 on 29 clones of *F. japonica*, 3 *F. x bohemica*, 6 *F. sachalinensis* and 7 *F. aubertii*. Stigmas were acetolysed in 25 μ L of a mixture of 8:1 acetic anhydride – H₂SO₄ and pollen was counted under a microscope at 100X. Fruit set was estimated from summer to autumn 2002 on 19 clones of *F. japonica*, 5 *F. x bohemica*, 6 *F. sachalinensis* and from summer to autumn 2004 on 10 *F. aubertii* plants. The fruit set was estimated as the ratio (number of ripe fruits) / (number of developed flowers produced per inflorescence) for three inflorescences per clone. As there is only one ovule in each flower, fruit set was equivalent to seed set. We were not able to estimate the fruit set of the hermaphrodite *F. sachalinensis* as it was unfortunately destroyed during experiment.

3.2.5. *Seed rain and seed bank*

We focused on *F. japonica* clones to assess the potential seed rain, the survival of seeds in the seed bank and the total seed production per clone. We estimated the potential seed rain and the total seed production per clone for 9 clones of *F. japonica* in autumn 2002 by recording the mean number of seeds ($seed_{stem}$) on 3 randomly selected stems and the mean number of stems ($stem_{unit}$) on 3 m⁻² per clone. The surface of each clone ($surf$) was estimated from its

two longest axes. The mean number of seeds produced per m^{-2} (potential seed rain) was estimated as $seed_{stem} \times stem_{unit}$. The total number of seeds produced per clone was estimated as $seed_{stem} \times stem_{unit} \times surf$.

To assess the survival of seeds in the seed bank, soil samples were collected under the canopy of 14 clones of *F. japonica* in the spring and in autumn 2003. For each clone, a sample of five bulked soil cores (4 cm diameter, 5 cm depth) was taken. The cores were divided into two layers, according to the soil depth: litter (the fibrous horizon with a high organic matter content) and 0-5 cm. Samples were air-dried at 20°C, sieved through a 2 mm mesh sieve and subsequently poured onto plastic containers filled with expanded clay (argex), covered with a sterilised garden compost-sand mix (3/4–1/4). Trays were placed in the greenhouse at a temperature of 20°C and a light period of 16 hours. Soil was kept moist by regular distilled water supply. Emerging seedlings were counted and removed as soon as they could be identified.

3.2.6. Seed viability

Seed viability was tested with a tetrazolium test (Kearns and Inouye 1993). Before treatment, seeds were saturated with distilled water at room temperature for one day, bisected through the embryo, incubated at 35°C for 2 hours in a 1% solution of 2,3,5 –triphenyl-2H-tetrazolium chloride and examined under a microscope. Twenty-five fresh seeds per clone were tested from 10 clones of *F. japonica* and 50 fresh seeds per clone on two clones of male sterile *F. sachalinensis*. The tetrazolium test was based on the visual reduction (development of red staining) of 2,3,5 –triphenyl-2H-tetrazolium chloride.

3.2.7. Seed germination

Three bulked seed lots were collected on 1) 5 clones of *F. japonica* in fall 2002, 2) 10 clones of *F. japonica* in fall 2003, and 3) two male sterile clones of *F. sachalinensis* in fall 2003. Due to the extremely low seed production, we were not able to assess germination capacity of *F. x bohemica*. Seeds from the different lots were dried at 25°C for 2 days and stored at room temperature until required. Our main interest was to test for the effect of cold humid period on germination rate of seeds. We then applied two stratification treatments to each seed lots: one in Petri dishes, one in compost. In Petri dishes, 50 seeds were sown per dish on wet filter paper. Five replicates per lot (10 for *F. japonica* in 2003) were set to germinate immediately without stratification after seed collection in a growth chamber at 22°C, 16 hours light ('Petri fresh' treatment). Five replicates (10 for *F. japonica* in 2003) were stored for 3 months at 4°C in the dark before being transferred to the immediate conditions ('Petri stratified' treatment). Germinating seeds were recorded everyday for 30 days after sowing. In compost, 50 seeds were sown in plastic containers filled with a commercial organic culture soil (expanded clay (argex) covered with a sterilised garden compost-sand mix (3/4 – 1/4)). Five replicates per seed lot (10 for *F. japonica* in 2003) were placed immediately in a greenhouse at 22°C and 16 hours light ('Compost fresh' treatment). Five replicates per seed lot (10 for *F. japonica* in 2003) were placed outside from December 2003 to the end of the spring 2004 in order to simulate natural germination conditions ('Compost stratified' treatment). The number of seedlings emerging was recorded every day during the period of emergence. Moreover, survival was recorded for each seedling from the 'compost stratified' treatment in 2002 during 135 days. Seed viability was tested on non-germinating and stratified seeds in Petri dishes using the tetrazolium test.

As the importance of *F. aubertii* in the studied landscapes appeared during the course of the study, germination tests were not included in the initial protocol for this species. Then, seeds were collected on two clones in fall 2004 and the compost treatment was used on this seed lot as described for the other species.

Field observations of germination and seedling establishment were performed during the spring and the summer of 2003 inside and around all the *Fallopia* clones in the vicinity of Gembloux. Sites were checked weekly for 5 months for evidence of new germinations or seedling development in the field.

3.2.8. Cytology

To gain more insight into the parental origin of seeds, chromosomes were counted in autumn 2004 on 12 seedlings resulting from the germination of 11 seeds collected on *F. japonica* and one seed on *F. sachalinensis*. Chromosomes were counted on fresh roots tips according to the method developed by Bailey and Stace (1992).

3.2.9. Flow cytometry

In order to gain more information on hybridisation pattern, ploidy level was measured by flow cytometry on 55 seedlings collected from four clones of *F. japonica* in the vicinity of Gembloux in autumn 2005. This technique allows the rapid determination of the relative DNA content of nuclei by measuring the fluorescence of a fluorochrome that specifically binds to DNA (Galbraith et al. 1983). Small leaf disks were chopped with a razor blade in Petri dishes, after addition of 500 μ L 100 mM sodium hydrogen phosphate at pH 7, and containing 0.5% Tween 20. After filtration through a 30 μ m nylon filter, 500 μ L of a solution

of 5g/L DAPI (fluorochrome) in 100 mM sodium hydrogen phosphate was added. Flow cytometry measurements were performed with a Partec machine (CA3 software 1995) equipped with a UV lamp. The fluorochrome was excited at 340 nm and emitted at 470 nm. A tetraploid individual (*Fallopia sachalinensis*) whose chromosome number was known was used as an internal standard for each measurement. We used the ratio ‘mean fluorescence intensity of seedling / mean fluorescence intensity of internal standard’ to assess the ploidy level of seedlings. To interpret our observations more accurately, we also used flow cytometry assessment of adult hybrids for which chromosome numbers had previously been counted (Tiébré et al. In press).

3.2.10. *Seed dispersal*

In autumn 2003, the dispersal capacity of *F. japonica* seeds was measured in-situ on two clones. According to the method of Bullock and Clarke (2000), seed traps were placed at doubling increasing distances from the edge of the clone (0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 16 m) along two transects per clone (SSE and SW: clone 1) (SSW and WSW: clone 2). Seed traps consisted of a 10 cm diameter by 12 cm long section of PVC tubing closed by a 0.1 mm net at the bottom and 2 cm grid at the top to limit seed predation. Seed traps were dug in so as to be level with the soil surface. The number of traps was doubled for each doubling distance to keep sampling effort constant, with two traps at the first three sampling distances (up to 1 m) (Bullock and Clarke 2000). Each seed trap was collected weekly for two months and the number of filled seeds was counted.

3.2.11. *Statistical analyses*

Concerning floral biology, comparisons between taxa were performed using one-way ANOVA followed by pairwise comparisons with Tukey-HSD post hoc tests for mean pollen/flower (square root transformation) and mean ovule length (logarithmic transformation). We used Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparisons between taxa with non-parametric Mann-Whitney test for mean pollen viability, mean ovule width, mean corolla diameter, mean number of pollen per stigma and mean fruit set, as they could not be successfully transformed.

For the germination experiment, we first focused on the effect of the stratification treatment in Petri dishes and compost independently. Within each seed lot (*F. japonica* 2002, *F. japonica* 2003 and *F. sachalinensis* 2003), mean germination percentages were compared between stratified and non-stratified treatments in Petri dishes and between stratified and non-stratified treatments in compost by t-tests. Second, in order to contrast germination success between years, we compared mean germination percentages between *F. japonica* 2002 and 2003 for each individual combination of stratification and substrate treatments independently (compost-fresh, compost-stratified, Petri-fresh, Petri-stratified), using t-tests. Third, in order to contrast germination success between taxon, we compared mean germination percentages between *F. japonica* 2003 and *F. sachalinensis* 2003 for each individual combination of stratification and substrate treatments independently (compost-fresh, compost-stratified, Petri-fresh, Petri-stratified), using t-tests. All germination percentages were arcsine-transformed before analysis. Mean are given with their standard deviation. Analyses were performed using XLSTAT (version 6-0, Addinsoft 2002), and Statistica (version 7-1, Statsoft Inc.2005).

3.3. Results

3.3.1. Floral biology

All *Fallopia japonica* and one *F. sachalinensis* clones showed high levels of male infertility with 0 to 4 and 0 to 40 pollen grains per flower, respectively (Table 3.1). None of the observed pollen grains were viable. Those clones were removed from statistical comparisons of means for those two characters. Other *F. sachalinensis*, *F. x bohemica* and *F. aubertii* clones had higher male fertility, with pollen grains per flower ranging, respectively, from 7306 to 8072, from 492 to 7280, and from 3718 to 12502. The highest values of pollen viability were observed for the hermaphrodite *F. sachalinensis* (63% to 97%) followed by *F. x bohemica* (3% to 48%). *Fallopia aubertii* showed lower pollen viability (1% to 13%). Significant difference was found for mean number of pollen grains per flower among taxa (Kruskal-Wallis test $H = 78.99$, $P = 0.000$) with *F. x bohemica* significantly differing from *F. aubertii*, whereas *F. sachalinensis* was not significantly different from the two other taxa. Significant differences were also found for mean pollen viability among the three taxa (Kruskal-Wallis test $H = 15.23$, $P = 0.000$), with all pairwise comparisons of means being significant.

Significant difference was found for mean ovule width among taxa (Kruskal-Wallis test $H = 34.51$, $P = 0.000$) with male sterile *F. japonica* and *F. sachalinensis* producing significantly larger ovules than hermaphrodite clones (Table 3.1). Mean corolla diameter was significantly different among taxa (Kruskal-Wallis test $H = 45.54$, $P < 0.0001$) with hermaphrodite clones producing significantly larger corolla than male sterile clones (except for the comparisons between male-sterile and hermaphrodite *F. sachalinensis*) (Table 3.1).

Table 3.1 Mean number of pollen grains per flower, pollen viability, ovule length and width, and diameter of the corolla of *F. japonica*, *F. sachalinensis*, *F. x bohemica* and *F. aubertii*. Standard deviations are given in brackets. The same superscript within a column indicates no significant difference between species. (F) refers to male sterile flowers; (H) refers to hermaphrodite flowers. Comparisons between taxa were performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD test for mean pollen/flower (square root transformation) and mean ovule length (logarithmic transformation), and using Kruskal-Wallis test followed by non-parametric Mann-Whitney test for mean pollen viability, mean ovule width and mean corolla diameter.

		Mean pollen per flower	Mean pollen viability (%)	Mean ovule length (mm)	Mean ovule width (mm)	Mean corolla diameter (mm)
<i>F. japonica</i>	F	0.10 (0.63)	0.00 (0.00)	0.58 (0.16) ^a	0.31 (0.06) ^a	3.76 (0.17) ^a
<i>F. sachalinensis</i>	F	8.00 (13.73)	0.00 (0.00)	0.72 (0.23) ^a	0.38 (0.16) ^a	3.98 (0.43) ^{ab}
<i>F. sachalinensis</i>	H	7689 (541.60) ^{ab}	79.87 (24.22) ^a	0.42 (0.08) ^a	0.21 (0.01) ^b	4.58 (0.11) ^{bc}
<i>F. x bohemica</i>	H	3643 (2432) ^a	21.34 (13.04) ^b	0.46 (0.10) ^a	0.23 (0.03) ^b	4.44 (0.39) ^c
<i>F. aubertii</i>	H	8318 (2616) ^b	7.43 (2.98) ^c	0.53 (0.10) ^a	0.24 (0.04) ^b	6.30 (0.62) ^d

Table 3.2 Mean number of pollen grains per stigma and fruit set after free pollination of *F. japonica*, *F. sachalinensis*, *F. x bohemica* and *F. aubertii*. Standard deviations are given in brackets. The same superscript within a column indicates no significant difference between species. (F) refers to male sterile flowers; (H) refers to hermaphrodite flowers. Nd: not determined. Kruskal-Wallis test followed by non-parametric Mann-Whitney test were used to test differences between species.

		Mean number of pollen per stigma	Mean fruit set (%)
<i>F. japonica</i>	F	0.68 (1.91) ^a	0.44 (1.04) ^a
<i>F. sachalinensis</i>	F	7.73 (9.35) ^b	5.06 (7.27) ^b
<i>F. sachalinensis</i>	H	4.67 (4.62) ^b	Nd
<i>F. x bohemica</i>	H	26.33 (37.09) ^b	0.01 (0.01) ^c
<i>F. aubertii</i>	H	1566 (1439) ^c	19.55 (24.91) ^b

The mean number of pollen grains deposited per stigma significantly varied among taxa (Kruskal Wallis test: $H = 78.99$, $P < 0.001$) with a high larger pollen load (8 to 5048 pollen grains) for *F. aubertii* as compared to other taxa, and very low pollen load (0 to 14 pollen grains) for *F. japonica* being significantly different from all other taxa (Table 3.2). Mean fruit set significantly differed among taxa (Kruskal Wallis test: $H = 19.06$, $P = 0.000$) with extremely low fruit set for the hybrid *F. x bohemica* (0% to 0.03%, significantly different from all other taxa), and the highest values observed for *F. aubertii* (0 to 35%, significantly different from all other taxa). Only an average of 0.4% of fruit set was observed for *F. japonica* (0% to 1.75%).

3.3.2. Seed rain and seed bank

Despite the very low fruit set observed for *F. japonica*, the estimated number of seeds produced per clone was very large due to the numerous flowers borne by each clone (range = 125348 - 1207217; mean \pm SD = 424597 ± 410789). This corresponded to a mean density of 1974 ± 1133 seeds m^{-2} (range = 361 - 3680). However, only three seedlings emerged from the seed bank in spring and two seedlings in autumn, respectively leading to a mean seed bank density of 34.12 ± 92.19 seeds m^{-2} in the spring and 22.75 ± 57.82 seeds m^{-2} in autumn. These five seedlings emerged from seeds found in the litter (2 in the spring and 1 in autumn).

3.3.3. Seed germination and viability

Germination percentages varied from $9.2 \pm 10.5\%$ to $64.4 \pm 24.5\%$ depending on seed lots and treatment (Figure 3.1). For germinations performed on seeds collected in 2002 from *F. japonica* clones, germination percentages differed significantly among fresh and stratified

seeds both on compost (t-test: $t = 4.0$, $P = 0.004$) and in Petri dishes (t-test: $t = 4.48$, $P = 0.002$). Germination was lowered by 60.6% and 85.7% after stratification on compost and Petri dishes, respectively. In contrast, for germination performed on seeds collected in 2003 from *F. japonica* and *F. sachalinensis*, no significant difference was observed among fresh and stratified seeds neither on compost nor in Petri dishes. When comparing mean germination percentages for each treatment among seeds collected in 2002 and 2003 from *F. japonica*, we found a significant decrease from 2002 to 2003 for fresh seeds both on compost (t-test: $t = 4.02$, $P = 0.001$) and in Petri dishes (t-test: $t = 2.85$, $P = 0.014$) and a significant increase for stratified seeds in Petri dishes (t-test: $t = -3.19$, $P = 0.007$). When comparing germination of seeds collected in 2003, no significant difference was found for the four treatments between *F. japonica* and *F. sachalinensis*. No germination was observed for seeds collected on *F. aubertii*.

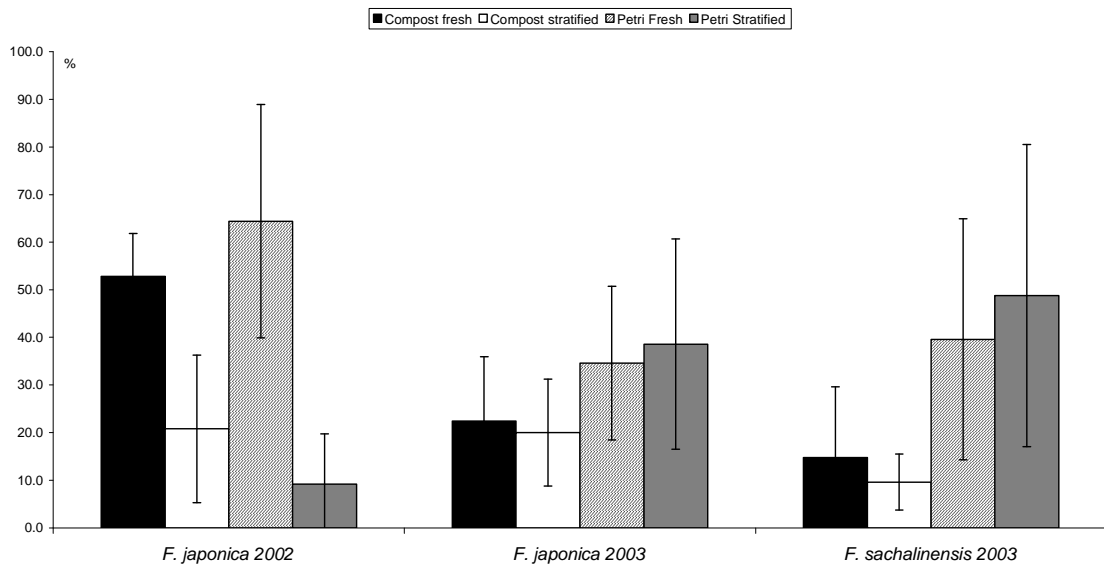


Fig. 3.1 Mean germination percentage of seeds collected on *F. japonica* in 2002 and 2003 and *F. sachalinensis* in 2003 with and without stratification. Whiskers are standard deviations. All data were arcsine-transformed.

Tetrazolium test revealed that $70.4\% \pm 19.5\%$ of fresh seeds (mean \pm SD) collected from *F. japonica* and $69.0 \pm 29.7\%$ from the male-sterile *F. sachalinensis* were viable. Tetrazolium test performed on non-germinating and stratified seeds indicated that those seeds were not viable in both species. A microbiological analysis showed that germination of seeds was inhibited by the presence of *Penicillium* mould. The extensive monitoring of seedling survival, in the field, indicated no evidence of seedling establishment. However, survival of seedlings from the ‘compost stratified’ treatment in 2002 was (mean \pm SD) = $20.8 \pm 15.5\%$ (range = 10.0 – 48.0) at the end of the germination experiment and decreased to $11.2 \pm 6.1\%$ (range = 2.0 – 16.0) after 135 days of growth.

3.3.4. Cytology

The most common observation (7/11) for seeds collected from *F. japonica* ($2n = 88$) consisted in seedlings with 54 chromosomes, for which putative paternal species should be *F. aubertii* ($2n = 20$). Four observations consisted of seedlings for which putative paternal species should be *F. x bohémica* (probable chromosome number $2n = 66$). These seedlings were characterized by different chromosome numbers from one nucleus to the other within the individual (Table 3.3). These seedlings gave aneuploid ranges between 78 and 79, 77 and 86, 103 and 105, and 104 to 110. The chromosome count of one seed collected from *F. sachalinensis* ($2n = 44$) showed 32 chromosomes, indicating *F. aubertii* ($2n = 20$) as the putative male parent.

Table 3.3 Seedling chromosome number, putative male parent and number of seedlings from seeds collected on *F. japonica* and *F. sachalinensis* species.

Maternal species	Seedling chromosome number	Putative male parent	Probable chromosome number of male parent	Male gamete	Number of seedlings
<i>F. japonica</i>	2n = 54	<i>F. aubertii</i>	2n = 20	x = 10	7/11.
<i>F. japonica</i>	2n = 103-105	<i>F. x bohémica</i>	2n = 66	x = 59-61	1/11.
<i>F. japonica</i>	2n = 104-110	<i>F. x bohémica</i>	2n = 66	x = 60-66	1/11.
<i>F. japonica</i>	2n = 77-86	<i>F. x bohémica</i>	2n = 66	x = 33-42	1/11.
<i>F. japonica</i>	2n = 78-79	<i>F. x bohémica</i>	2n = 66	x = 34-35	1/11.
<i>F. sachalinensis</i>	2n = 32	<i>F. aubertii</i>	2n = 20	x = 10	1/1.

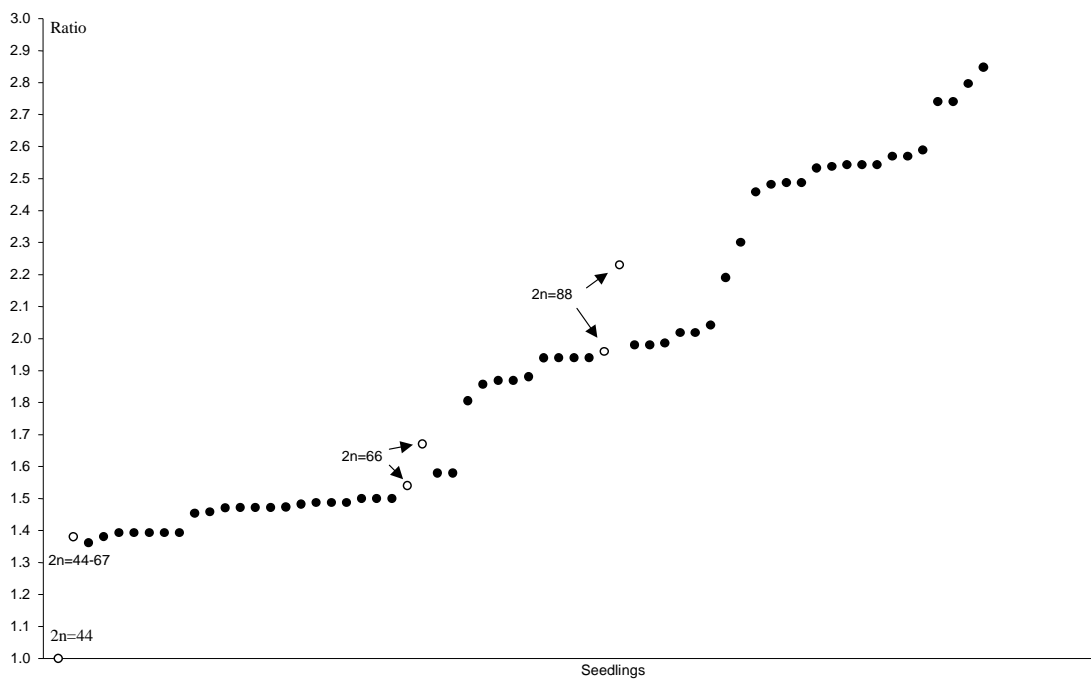


Fig. 3.2 Fluorescence intensity ratios for seedlings collected from *F. japonica* and reference adult hybrids. Closed circles are peak ratios for the different observed seedlings arranged in increasing order. Open circles are minimal and maximal peak ratios observed for adult hybrids with a known chromosome number.

3.3.5. Flow cytometry

Clear discontinuities in the frequency distribution of fluorescence intensities allowed estimating the ploidy level of the seedlings sampled by comparison to fluorescence intensities of adult hybrids with known chromosome numbers (Figure 3.2). Seven (12.7%) seedlings exhibited peak ratios ranging from 1.36 to 1.39. This corresponded to the peak ratio of an adult hybrid with $2n$ varying from 44 to 66. Those seedlings were most probably hexaploid hybrids with *F. sachalinensis* that, in addition to the normal chromosome number ($2n = 66$) suffered from mitotic alterations. Fourteen (25.4%) seedlings displayed peak ratios ranging from 1.46 to 1.50. This range did not fit any observation on adult hybrid but the intermediate position of those seedlings between hybrid adults with $2n = 44$ and $2n = 66$ suggest the probability of crosses with *F. aubertii* ($2n = 20$) leading to hybrids that should exhibit $2n = 54$. Because of the larger size of *F. aubertii* chromosomes (Bailey, 1989), it is expected that the fluorescence peak ratio was not directly proportional to the number of chromosomes when compared to hybrids with other parental species. A third group consisted of two observations (3.6%) with a peak ratio of 1.58 included in the observed range for adult hexaploid hybrids ($2n = 66$) with *F. sachalinensis* as paternal parent. Eventually, a fourth group with 32 observations (58.3%) displayed peak ratios ranging from 1.81 to 2.85. Those seedlings may result from different situations in which crossing with unreduced gametes are likely to play a major role: octoploid hybrids resulting from crossing with unreduced pollen of *F. sachalinensis*, backcross with totally to partially reduced pollen of *F. x bohémica* leading to chromosome numbers varying around 77, and backcross with totally to partially unreduced gametes of *F. x bohémica* leading to chromosome numbers varying around 110. Those last two situations were found in our cytological observations on seedlings (see above).

3.3.6. Seed dispersal

In total, 160 seeds were trapped over the four transects with 88% at the first two positions near the clone (≤ 0.5 m). These results indicated that the majority of seeds fell near the maternal clone (Figure 3.3). When data were pooled across transects, seeds density followed an inverse exponential distribution ($R^2 = 0.478$, $P = 0.000$, slope = -1.29). However, the tail of the curve indicated a capacity for dispersal beyond 16 m with a small proportion of seeds (1.10%; 0 to 21 seeds) moved at 16 m.

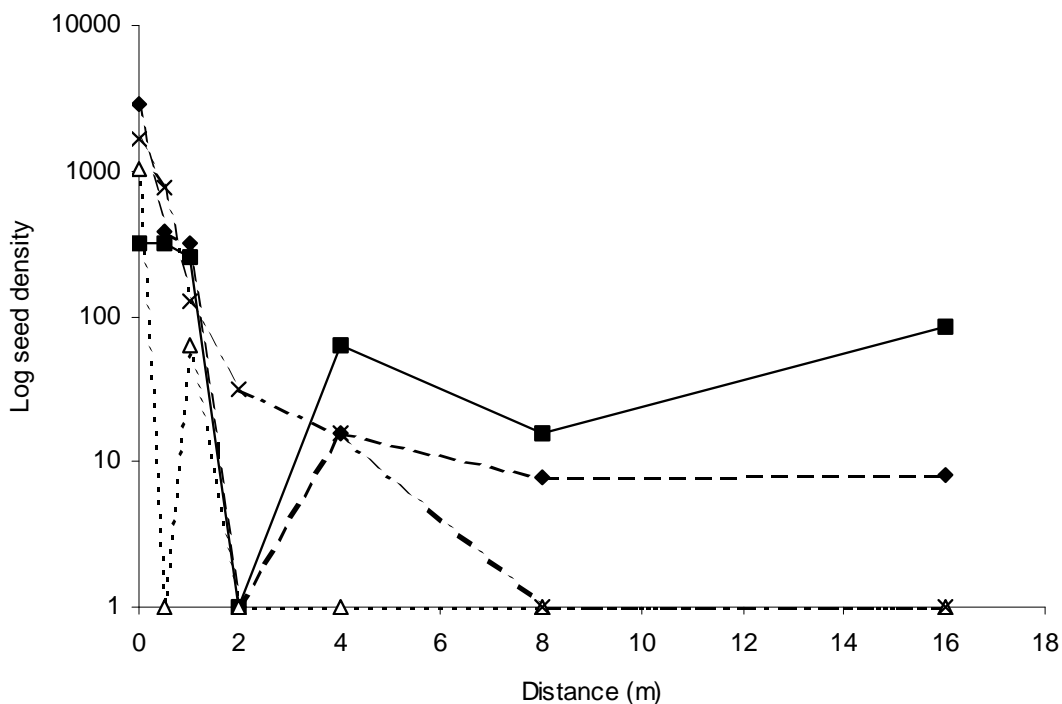


Fig. 3.3 Observed dispersal capacity for *F. japonica* in seed trap experiment along two transects per clone. Clone 1: ♦ SSE, ■ SW; Clone 2: △ SSW; × WSW.

3.4. Discussion

3.4.1. Extensive sexual reproduction by hybridization

Vegetative regeneration is recognized as the main mode of reproduction of knotweeds outside their native range (Beerling et al., 1994; Child and Wade, 2000; Weber, 2003). However, the possibility of sexual reproduction is a crucial feature, not only because of the possibility for seed production but also because producing new genotypes can further enhance the invasive ability of knotweeds. Although extensive studies have already been conducted by Bailey et al. (1995) in the UK, no data were available until now concerning the potential for sexual reproduction in western continental Europe.

In our study, we confirmed the male sterile status of *F. japonica* and, in close agreement with observations previously conducted in the British Isles (Bailey, 1994), we demonstrated the possibility of the restoration of sexual reproduction of *F. japonica* through hybridization processes in the adventive range. Other taxa from the *Fallopia* complex present in Belgium (*F. sachalinensis*, *F. aubertii*, *F. x bohemica*) displayed clones producing viable pollen and constituted potential source for hybridisation with *F. japonica*. In vitro pollen germination experiments performed by Bailey (1994) confirmed that *F. japonica* is capable of fertilization when presented with the pollen of other species or hybrids in the section naturalized in the British countryside. Our results based on chromosome counts and polyploidy level assessment by flow cytometry demonstrated that in Belgium as well, three taxa participated to hybridisation with *F. japonica*. The most commonly adopted position in Belgium is that *F. sachalinensis* is the paternal species hybridising with *F. japonica* (Lambinon et al., 2004). However, our observations revealed that a majority of seeds collected from *F. japonica* turned out to result from backcrosses with *F. x bohemica* and crosses with *F. aubertii*. In addition,

we found that two other taxa, *F. sachalinensis* and *F. aubertii*, produced seeds, a feature that may promote the invasive success of the complex in the study zone. Nevertheless, the significance of seed production in regard to invasive success may vary among taxa as germination success turned out to be different. Interspecific hybridisation associated with seed production results in an intricate situation in the *Fallopia* complex where the role of each taxon in the invasive success of the complex may be different.

Despite its hybridisation with *F. japonica* and its production of seed, the role of *F. aubertii* in the invasive success of *Fallopia* in the study zone is probably currently still limited. *Fallopia aubertii* exhibited the highest seed set but we did not observe any germination for those seeds in a germination experiment on compost. Further analyses are needed to assess the paternal origin of those seeds. A set of arguments suggest that they should also result mainly from hybridisation with other taxa: 1) only a small proportion of the pollen produced by the species was viable, 2) this species has been shown to exhibit very strong self-incompatible reaction (Bailey, 1994), and we found that all the clones of the species share the same genotype (Tiébré et al. In press). Currently, seed production in *F. aubertii* is probably of low importance for the invasive success of the *Fallopia* complex. Additionally, we found that a large proportion of seeds borne by *F. japonica* originated from hybridisation with *F. aubertii* and at least, some of those seeds were viable as they germinated. This points to the potential important role of *F. aubertii* in restoring sexual reproduction in *F. japonica*. However those hybrids are still of low importance in the study zone as we did not detect the resulting hybrid, *F. x conollyana* in a large survey of adult *Fallopia* clones across Belgium (Tiébré et al. In press). This suggests that field condition may be inadequate for the development of those hybrids in the study zone: climate might be a major constraint. In a study focusing on *F. x conollyana*, the hybrid between *F. japonica* and *F. aubertii* (*F. baldschuanica*), Bailey (2001, 2003) argued that seeds which give rise to *F. x conollyana* often contain enough endosperm

for germination (leading to good viability tests) but there is frequently a gap between the pericarp and the endosperm which could enable the development of soil fungi in damp winter conditions.

The presence of *F. sachalinensis* was more important than generally reported for the territory (Lambinon et al., 2004). Both male-sterile and hermaphrodite stands of *F. sachalinensis* were detected but the hermaphrodite seemed to be much more rare (only one single male-fertile clone found). However, since male-fertile individuals seemed to be quite rare in Belgium, the potential for recurrent hybrid formation with *F. japonica* (or other *Fallopia* taxa) should not be widespread but more restricted to sympatric areas. Unfortunately, we were not able to assess the fruit set of the hermaphrodite *F. sachalinensis* as the clone was destroyed before the end of the experiment. The fruit set of 5.0 % observed for the male-sterile clones reached the same order of magnitude as the British clones (Bailey, 1989), this species being rarely capable of self-fertilization (Bailey, 1994). We stress that despite a more discrete occurrence in Belgium, the influence of *F. sachalinensis* within the invasive knotweeds complex should not be underestimated. Due to the huge number of inflorescence per clone, *F. sachalinensis* is capable of producing numerous seeds. It is a donor of pollen for *F. japonica* generating the hybrid taxon *F. x bohémica* and moreover, it is capable of vigorous vegetative regeneration mainly from stems (Bímová et al., 2003).

Fallopia x bohémica has also been considered as rare in Belgium and was only described as a hybrid of horticultural origin (Lambinon et al., 2004). However, preliminary investigations on adult clones in the study area based on flow cytometry analysis and molecular markers indicate that the occurrence of the hybrids has been underestimated: *F. x bohémica* is actually widely distributed across Belgium though its frequency varies between regions (Tiébré et al. In press). The widespread distribution of *F. x bohémica* in the study landscapes, together with the demonstrated production of large amount of partially viable pollen is consistent with the

finding that a majority of seeds produced by *F. japonica* originated from backcrosses with *F. x bohemica*. The resulting seedlings showed a variety of chromosome numbers, most probably as a consequence of fertilization with unreduced or partially reduced pollen, due to the very irregular meiosis of the paternal hexaploid *F. x bohemica* with the formation of univalents, bivalents, trivalents and rare quadrivalents (Bailey and Stace, 1992; Bailey, 1994, 2003). Obviously, *F. x bohemica* has become a major component of the invasive success of exotic *Fallopia* in the study zone as it promotes the sexual reproduction of *F. japonica* and may restore genotypic diversity and adaptation potential in the adventive area (Hollingsworth and Bailey, 2000a). In addition, *F. x bohemica* has been shown to exhibit higher vegetative regeneration potential than all relating taxa in the Czech Republic (Bímová et al., 2003). In contrast, seed set of *F. x bohemica* was almost nil, a common feature of hybrid plants.

3.4.2. *The fate of seeds produced by F. japonica*

Seed set of *F. japonica* was very low, from 0% to less than 2%, a feature that should be related to the low pollination success observed (on average less than one pollen grain per stigma). Nevertheless, the very low fruit set observed in *F. japonica* must be balanced against the huge amount of flowers borne by each clone, leading to a very important total production of seed and potential seed rain per clone. In addition, controlled germination experiments revealed that the germination of seeds is possible even after stratification treatment. Considering the high potential for regeneration by seeds, a puzzling observation was that field observations did not indicate any successful germination or seedling establishment in the study area. Furthermore, although the majority of seeds fell near the maternal clone, we observed a very small seed banks in spring and autumn despite the extensive potential seed rain and density: only five seedlings emerged from the seed bank. As a result, the seed bank

of the Japanese knotweed may be considered as inconsequential or transient (Bakker et al. 1996, Thompson et al. 1997, Bisteau and Mahy 2004). One hypothesis may be that seeds suffered from high predation rate. Certainly, some seeds were eaten by birds. Bailey et al. (1995) reported that some plants in Leicester had been completely stripped of their seeds by house sparrows (*Passer domesticus*). Further experiments are needed to fully explore pre- and post-dispersal seed predation and the way it may affect seed bank formation. A second hypothesis may be that experimental germination conditions on compost were more favourable than in the field. In germination experiments conducted in North America, Forman and Kesseli (2003) also showed that *F. japonica* produced large quantities of seeds that had high germination capacity, but in contrast to our study, they observed many seedlings in the field. The authors argued that seedling survival is likely to be more dependent on the availability of adequate resources such as light and water, than on temperature. In the present study sites, uninvaded adjacent vegetation was dense and composed of herbaceous perennial vegetation, which might have exerted heavy competition preventing *Fallopia* seedlings from growing. Bailey et al. (1995) also pointed out that edaphic and climatic factors are critical for seed germination in the first place and survival after the winter. As in 2002, we found that stratification induced a significant reduction of germination success, we can suggest a negative effect of cold humid winter on seedling survival, at least some years. Under the assumption of global warming (Dukes and Mooney 1999), milder winters might result in greater germination percentages. We should also consider that germination events in the field might be rare or site-specific, failing to be detected by our survey. The high occurrence of adult hybrids in the study area and the observation of high genotypic diversity of these hybrids (Tiébré et al. In press), similar to that observed in the UK (Hollingsworth et al., 1998), indicated that seedling establishment occur in the field, albeit probably at low

percentage in comparison to the total seed rain. Further experiments are needed to assess the best conditions for hybrid seedling establishment.

The seed trap experiment showed that the majority of seed produced by *F. japonica* fell near the maternal clone, a general pattern of dispersion in plant species (Bullock and Clarke, 2000). However, a small proportion of seed was collected in the farthest traps indicating that seeds may be dispersed beyond 16 m, which leads to the possibility of founding a new and genetically different clone. To our knowledge, this is the first assessment of dispersal capacity of hybrid seeds. Moreover, in the case of plants growing next to riverbanks, which are often observed in Belgium (Lambinon et al., 2004), there is a good chance of hybrid seeds being dispersed downstream for much greater distances, increasing the invasive potential of the complex.

3.5. Conclusion

Hybridization processes combined with polyploidy can lead to genotypic and genomic alterations, resulting in an increase in genetic diversity (Bretagnolle et al. 1998, Soltis and Soltis 2000, Wendel 2000, Liu and Wendel 2003, Doyle et al. 2004, Soltis et al. 2004) and stimulating invasiveness (Ellstrand and Schierenbeck, 2000). The intensification of human activities has provided new opportunities for interspecific hybridization and the setting of new niches that suit hybrids better than their parents (Vilà et al., 2000). The restoration of sexual reproduction in *F. japonica* by hybridisation with related taxa could generate considerable genotypic diversity, which was lacking in the adventive range (Hollingsworth et al., 1998). This may increase the ability of the *Fallopia* complex to adapt to new environments. Moreover, the newly formed genotypes would be fixed by extensive vegetative regeneration. The extensive sexual reproduction by hybridization we observed in the present study could

further contribute to the dramatic invasive success of knotweeds in Belgium and should not be underestimated, particularly in the face of global change. It adds a new dimension to the control and management measures required for these plants (Child and Wade 2000, Pashley et al. 2003). Although extensive efforts must be devoted to control vegetative spread, attention should also be paid to preventing the formation of new clones of hybrid origin by acting before the flowering period. Moreover, we demonstrated that the ornamental *F. aubertii*, broadly available for sale in Belgium, significantly outcrosses with wild clones of knotweeds. Considering the potential for hybrid adaptation to environmental conditions modifications, we suggest that this species should no longer be commercialised.

Annexes



Annexe 3.1 Les inflorescences dressées et peu ramifiées de *Fallopia japonica*.



Annexe 3.2 Une inflorescence compacte et courbée de *Fallopia sachalinensis*.



Annexe 3.3 Les inflorescences denses et ramifiées de *Fallopia x bohemica*.



Annexe 3.4 Le dispositif expérimental montrant l'estimation de la pluie de graines et la production totale de graines dans une population de *Fallopia japonica*.



Annexe 3.5 Le dispositif expérimental montrant a) la collecte des échantillons pour l'estimation de la banque de graines et b) les deux couches examinées : la litière et les cinq premiers centimètres de sol dans une population de *Fallopia japonica*.



Annexe 3.6 Le dispositif expérimental montrant l'estimation de la capacité de dispersion des graines d'une population de *Fallopia japonica* par les pièges à graines le long d'un transect Sud-Sud-Est.



Annexe 3.6 Une plantule issue de la germination d'une graine prélevée sur *Fallopia japonica*.



© Béatrice LAGRANGE

Annexe 3.7 Des fruits prélevés sur des renouées du Japon. De la gauche vers la droite, sur *Fallopia japonica*, sur *Fallopia x bohémica* et sur *Fallopia sachalinensis*.

Chapter 4: Landscape scale distribution and habitat selection by invasive alien species *Fallopia* (Polygonaceae) complex in Belgium ¹

Abstract. In this paper, we analysed at a landscape scale the distribution and dynamics of colonization of habitat patches by four invasive alien clonal *Fallopia* taxa, in Belgium. We focused on the habitat selection and distinguished between the dynamics of colonization of new habitat patches at the landscape scale and spread of existing individuals within patches. The rates of colonization of new habitat patches were lower and the rates of expansion of existing individuals within patches were higher. Our results suggested that the dynamics of colonization of new habitat patches mainly resulted from clonal propagation. The rates of spread of *Fallopia* taxa observed in the present study suggested different dynamics of distribution between taxa and hybrids. Despite these differences, *F. japonica* and the hybrid *F. x bohémica* exhibited the same pattern of habitat selection. The distribution of *Fallopia* taxa was related to the occurrence of disturbed habitats at the landscape scale. Our results point to the importance of analysis of the distribution of invasive alien species at small landscape scales before the settling of management priorities for invasion control and habitat protection.

Key words: Belgium, dynamics of colonization, *Fallopia*, habitat selection index, hybridization, invasive plant, landscape scale distribution, Polygonaceae, propagule pressure, rate of spread.

4.1. Introduction

Invasions by alien species are considered one of the most severe threats to global biodiversity (Vitousek et al. 1997, Wilcove 1998). The distribution of invasive species at a landscape scale is a product of the interactions between colonization, extinction, competition and evolution (Huang and Zhang 2007). Analysing the pattern of distribution of invasive alien species at a landscape scale is a key step in the settling of management priorities for invasion control and habitat protection (Hobbs and Humphries 1995, Collingham et al. 2000, Marvier et al. 2004). Most research on the distribution of invasive alien species have focused on the rates of spread at large-scales (Conolly 1977, Perrins et al. 1993, Godefroid 1996). Invasibility of ecosystems has been investigated (Lonsdale 1999, Pyšek and Richardson 2006) but the spatial scales of analyses were often too large to provide detailed data on habitat selection at a landscape scale and dynamics of colonization of habitat patches (Collingham et al. 2000). Study of the habitat selection by a species is a key feature because it allows assessing the species ecological requirements and justify the protection of key areas (Holbrook and Schmitt 1988, Arthur et al. 1996). The use of habitat selection indices provides a quantitative measure of the relative use of habitats in proportion to their availability (Cock 1978, Buse 1988, Manly et al. 1993, Kamler and Gipson 2000, Duriez et al. 2005, Zimmer and Power 2006).

Land use directly affects the invasion process by modifying disturbance regimes and environmental conditions (Pauchard and Alaback 2004). Disturbance facilitates plant invasion by overcoming physical and environmental barriers (Parendes and Jones 2000, Song et al. 2005). Human disturbance often increases resources availability and thus makes disturbed habitats more susceptible to invasion (Forman and Alexander 1998).

Another aspect of the distribution of invasive species at a landscape scale concerns the mechanisms of invasion along the linear networks (communication routes and borders of

habitats). Destructive flooding, road and rail constructions incur considerable disturbance of natural communities, baring soil, clearing natural vegetation, admitting light to ground layer and altering drainage (Christen and Matlack 2006, Richardson et al. 2007). Those systems are dominated by disturbance-tolerant species and are prone to invasion by alien species, which are often disturbance adapted (Fox and Fox 1986, Panetta and Hopkins 1991, Forman and Alexander 1998). Linear networks may also act as foci for subsequent spread into adjacent habitats (Pyšek and Prach 1993, Christen and Matlack 2006, Richardson et al. 2007).

In the current study, we explore the habitat selection and the dynamics of spread of four clonal invasive alien plants of the genus *Fallopia* Adans. (Polygonaceae) at a landscape scale in Belgium: *F. japonica* (Houtt.) Ronse Decraene, *F. sachalinensis* (F. Schmidt Petrop.) Ronse Decraene, *F. x bohemica* (Chrték et Chrtková) J.P. Bailey, the apparent hybrid between the first two taxa, and the climbing perennial *F. aubertii* (L. Henry) Holub (Syn. *F. baldschuanica* (Regel) Holub). Species from the genus *Fallopia* are among the most troublesome invasive alien species in Europe and North America (Weber 2003). Belgium and neighbour countries have been exposed to alien *Fallopia* since the end of the 1800s when plants were deliberately introduced for ornamental purposes and fodder (Vanden Berghen 1997) from Asia (China, Japan, parts of Korea and Taiwan). At the beginning of the 20th century, plants were still rare and thanks to various accidental introductions in natural habitats, have spread after 1945 (Godefroid 1996, Vanden Berghen 1997). Those taxa are now widely naturalized and some of them became invasive. Invasive alien *Fallopia* are extremely difficult to control by both manual and chemical methods. The combination of a huge vegetative propagation (Bímová et al. 2003, Pashley et al. 2007), a high competitive capacity (Mandák et al. 2004), hybridization and polyploidization (Tiébré et al. In press) and potential sexual reproduction (Child and Wade 2000, Hathaway 2000, Tiébré et al. 2007) may greatly contribute to the dramatic success of these invasive plants.

The spatial distribution of *Fallopia* plants was mapped at the European scale (Jalas and Suominen 1979, Bailey and Wisskirchen 2006). Others studies focused on the rates of spread of *Fallopia* taxa at the country scale (Conolly 1977, Mandák et al. 2004). As a result, there was an increase in data resolution with decreasing spatial extent (Collingham et al. 2000). Further studies attempted to identify invaded habitats in the British Isles (Beerling 1991, Beerling et al. 1994, Bailey et al. 1996, Child and de Waal 1997, Hathaway 2000), the Czech Republic (Pyšek and Prach 1993, Mandák et al. 2004), and France (Jager 1994, Boyer 2002, Voinot et al. 2002), but these analyses were mainly descriptive. No studies were performed so far on the habitat selection by invasive *Fallopia* species at a landscape scale and on the dynamics of colonization of habitat patches.

In addition, vegetation regeneration is recognized as the main mode of reproduction of *Fallopia* taxa outside their native range (Beerling et al. 1994, Child and Wade 2000, Weber 2003). However, multiple interspecific hybridization events have been described within these invasive alien plants (Bailey and Stace 1992, Bailey 2003b, Mandák et al. 2003, Tiébré et al. 2007, Tiébré et al. In press) demonstrating the restoration of sexual reproduction within the complex, an increase of the propagule pressure with hybrid seed production and dispersion and an increase of the genotypic diversity in the hybrid *F. x bohemica* as compared to the parental species. It was also demonstrated that *F. x bohemica*, the apparent hybrid between *F. japonica* and *F. sachalinensis* grows and spreads faster compared to its parents (Bímová et al. 2003, Mandák et al. 2004). It is stressed that these differences in genotypic diversity, reproduction success and regeneration characteristics may induce different rates of invasion between *Fallopia* taxa and the hybrid and different dynamics of distribution at the landscape scale.

In this paper, we studied the distribution and dynamics of *Fallopia* taxa at the landscape scale with the specific aim to test two hypothesis : 1) *Fallopia* taxa colonize preferentially human-

disturbed habitats; 2) Sexual reproduction plays a significant role in the dynamics of *Fallopia* populations resulting in higher dynamic for the hybrid *F. xbohemica* as compared to the parental species.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Study area and population survey

This study was conducted on the upper basin of the Orneau river in Gembloux, Belgium (50°33'N; 4°41'E). The study area is a semi-rural landscape of 1118 ha dominated by agricultural and urban land uses (Figure 4.1). We performed a complete landscape survey in September / October 2001, 2002 and 2003 to locate all individuals of *F. japonica*, *F. sachalinensis*, *F. x bohemica* and *F. aubertii* using 1/10000 topographical map (National Geographical Institute, Belgium). Due to high clonality of *Fallopia* spp., distinguishing ramet from genet within habitat patch is difficult. As our approach aims at identifying dynamics of foci points, we arbitrarily considered that two ramets or group of ramets separated by more than one meter represented two different individuals. We are aware that those different ramets may belong to the same clone but it does not pose problems for our task. We recorded the following data for each individual: taxonomic status, width and length of the individual, and location. The area covered by each individual was estimated from its two longest axes. Data were transferred into a land use cover map Top10v-GIS (National Geographical Institute, Belgium) using Arcview (version 3.2, Environmental Systems Research Institute Inc.).

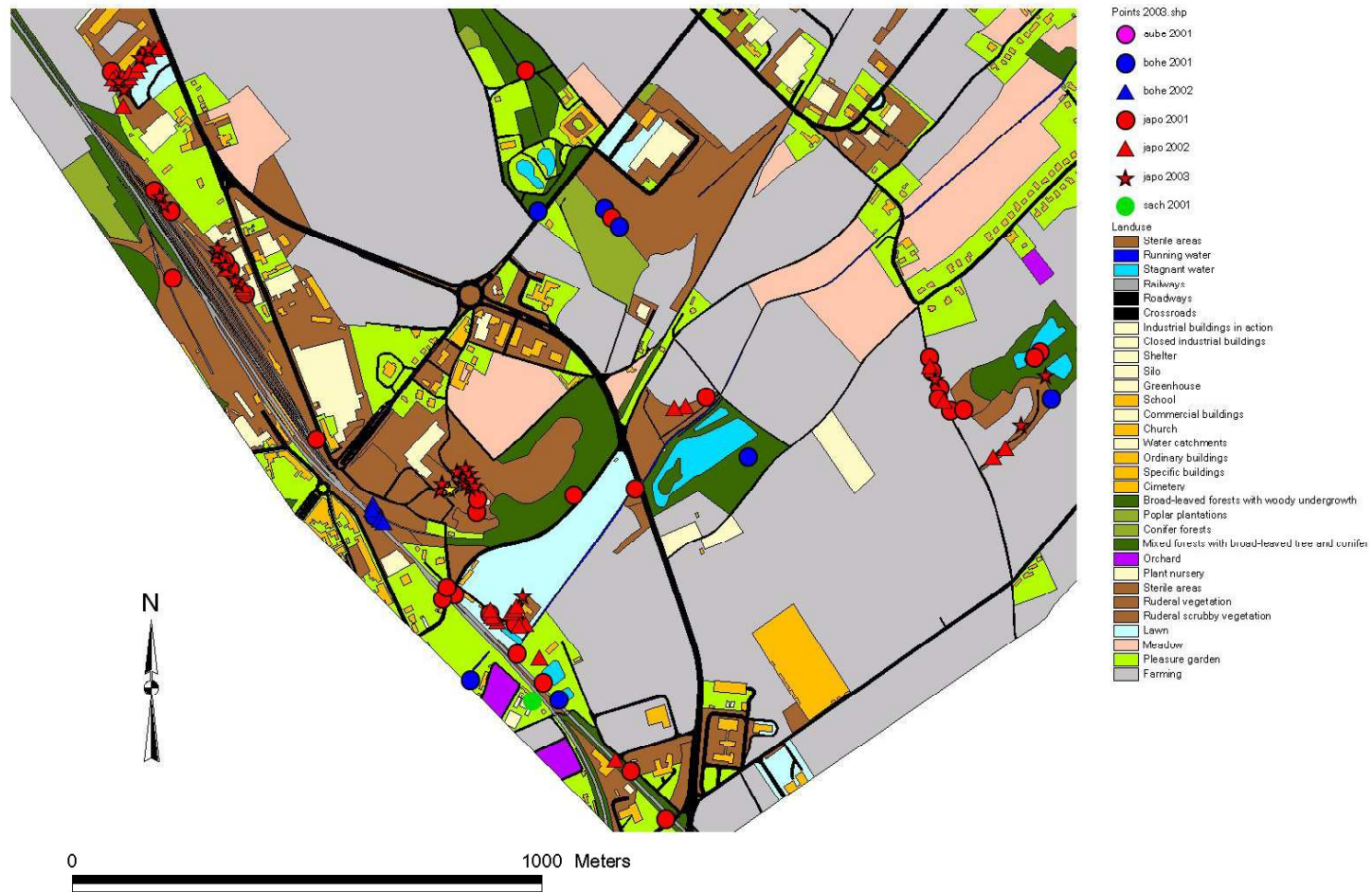


Fig. 4.1 Location of *Fallopia* taxa and spatial configuration at the upper basin of the Orneau river in Gembloux, Belgium, 2001-2003. The different land use types are grouped in more general classes with similar level of resolution. For details see the point 4.2.2.

4.2.2. *Habitat assessment*

The structure of the landscape (habitat composition and spatial configuration) was characterized on the basis of recent land use cover maps (IGN TOP10V-GIS). The TOP10V-GIS database provides different levels of resolution depending on the class of habitats with for example, detailed localisation of some types of building as compared to a general class for cultivated land. We then grouped the different land use types in more general classes with a similar level of resolution: natural / semi-natural forest (broad-leaved forests with woody undergrowth and mixed forests with broad-leaved tree and conifer), exotic plantation (poplar plantations and conifer forests), lawn, meadow, orchard, farming, ruderals (ruderal and ruderal scrubby vegetations, brushwood and sterile areas such as waste places), urban non-industrial (intensive human use with much of the land covered by specific and ordinary buildings, school, pleasure garden, cemetery and church), urban industrial (commercial, closed industrial and industrial buildings in action, shelter, silo, plant nursery, greenhouse, and water catchments), marshland, stagnant water, running water, roadways, and railways. For convenience, rivers, roadways, and railways were referred to collectively as the communication routes in this paper.

4.2.3. *Habitat selection*

Habitat selection was assessed for each taxon independently each year with the selection index $B_i = [(n_i / N) / (S_i / S)]$ (Manly et al. 1993) where n_i is the surface occupied by the individuals of the taxon in the i^{th} habitat, N the surface occupied by all individuals of the taxon, S_i the surface occupied by the i^{th} habitat and, S the total surface of the landscape studied. We used surface instead of number of individuals because the number of individuals

may be a biased estimation of the importance of the taxon in a habitat due to the high clonality. If habitat use is random, the expected value of B_i will be 1.0 for each habitat type. Significant departures from 1.0 indicate that use is selective. We used chi-square analyses to determine which habitats are used more or less than would be expected under random distribution of individuals by comparing use of each habitat type to its availability. Analyses were performed using Minitab 2006 (version 15.1.0.0, Minitab Inc.). The number of individuals of *F. sachalinensis* (one individual) and *F. aubertii* (three individuals) was too low to estimate selection indices, so both taxa were not used in statistical analyses.

Preliminary analysis showed that individuals of *Fallopia* were often present at the edge of habitat patches. As the conditions at the ecotone may be different from those in the core of the habitat patches, we also assessed the habitat selection along the border of habitat types for each taxon each year with the selection index $B_i = [(n_i / N) / (P_i / P)]$, where P_i the perimeter of the i^{th} habitat, and P the perimeter of all habitat patches within the landscape unit.

We assessed the distribution of *Fallopia* individuals along the border of communication routes. Buffers of 5 m, and 10 m were delimited along railways, roadways, and rivers, and percentages of individuals situated within these buffers were assessed for each year.

4.2.4. Dynamics of *Fallopia* populations

We first assessed the global dynamics of spread of *Fallopia* taxa by estimating the density of individuals per square kilometre for each taxon each year and calculating the rate of increase for each year as the ratio $(\text{density of individuals}_{\text{year } x}) / (\text{density of individuals}_{\text{year } x - 1}) \times 100$.

We also estimated the rate of emergence of new individuals as the ratio $(\text{new individuals}_{\text{year } x}) / (\text{individuals}_{\text{year } x - 1}) \times 100$ and the rate of extinction for each taxon as the ratio $(\text{extinct individuals}_{\text{year } x}) / (\text{individuals}_{\text{year } x - 1}) \times 100$.

To evaluate the relative part of the dynamics due to colonization of new patches as compared to propagation within occupied patches, we estimated the dynamics of patch colonization for the different taxa by recording, each year, the number of previously unoccupied patches that were colonized and the number of patches previously occupied in which *Fallopia* individuals went extinct.

To characterize *Fallopia* propagation along linear landscape elements, we followed the dynamics of growth of *Fallopia* individuals along a 3 km segment of a high traffic roadway connecting Gembloux to Louvain-la-Neuve (Nationale 4, 50°40'N; 4° 37'E). Each individual was precisely located and its length was measured at four periods: September 2001, May 2002, July 2003 and August 2003 using a decametre (Stabila, Germany). The growth of each individual was assessed as the ratio: (observed length for a given period - length of the previous period) /length of the previous period.

4.3. Results

4.3.1. Habitat selection

The relative surface of habitat types at the upper basin of the Orneau river was: 59.0 % farming, 12.0 % urban non-industrial, 11.0 % meadow, 7.0 % ruderals, 4.0 % communication routes, 3.0 % forests, 2.0 % urban industrial, 1.0 % lawn, and a trace of orchard, marshland and stagnant water (Figure 4.2), corresponding to 2175 habitat patches with a mean size \pm s.d. = 80 ± 172 ha. During the study period, we did not observe any significant changes in the landscape structure but disturbances were recorded such as new ordinary and industrial buildings and soil displacement. The habitat types mostly concerned were ruderals, farming, urban industrial, and the border of communication routes.

At the beginning of the study, the mean surface occupied by *Fallopia* individuals was (mean \pm s.d.) = $150 \pm 175 \text{ m}^2$, ranging from 1 to 923 m^2 . Seventy-seven individuals were found (3 *F. aubertii*, 11 *F. x bohemica*, 62 *F. japonica*, and 1 *F. sachalinensis*) for a total surface of 11538 m^2 . This corresponds to 0.1 % of the total landscape area. The density for all target taxa was 6.9 individuals per square kilometre (*F. japonica*: 5.5 individuals per square kilometre; *F. x bohemica*: 1.0 individuals per square kilometre; *F. sachalinensis*: 0.1 individuals per square kilometre and *F. aubertii*: 0.3 individuals per square kilometre).

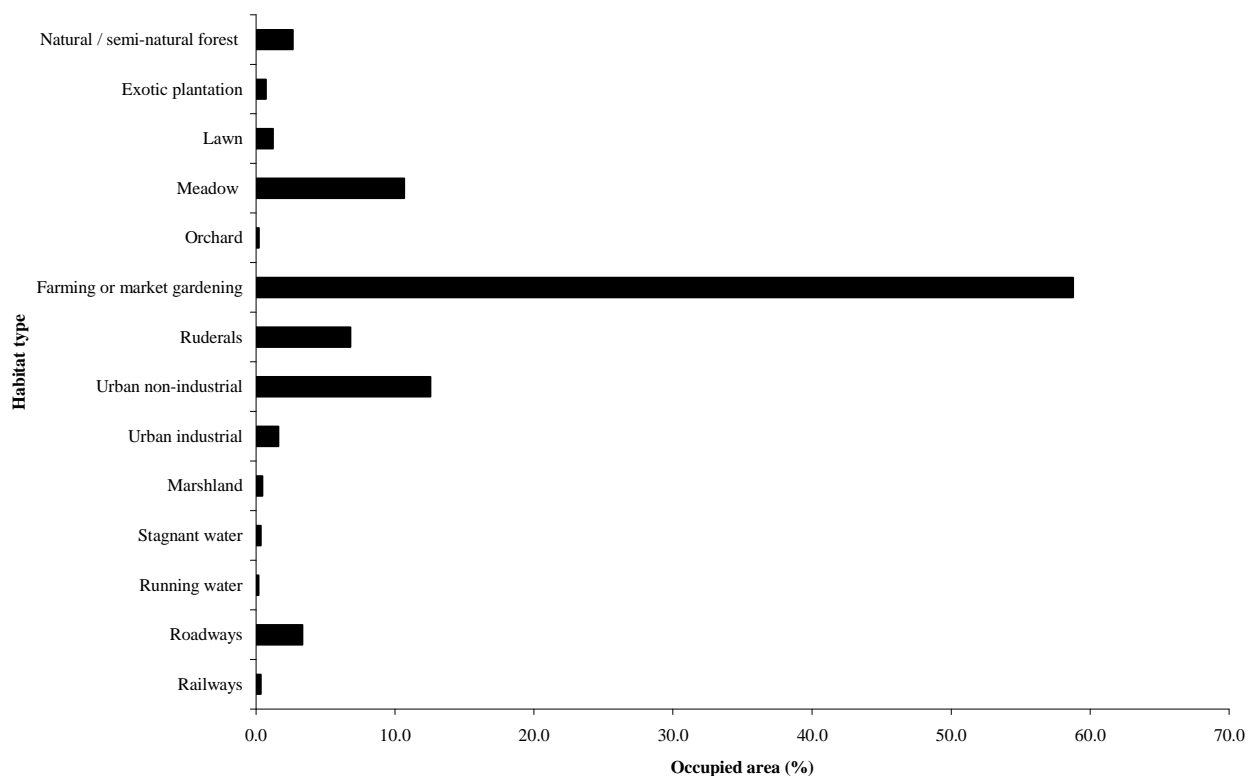


Fig. 4.2 Landscape composition at the upper basin of the Orneau river in Gembloux, Belgium, 2001-2003.

In 2002, 54 additional individuals were observed (7 *F. x bohemica* and 47 *F. japonica*) and one individual of *F. japonica* died. The surface occupied by *Fallopia* taxa was 12067 m^2 . This corresponded to an increased of 5.2 %. The mean size of individuals (mean \pm s.d. = 93 ± 152

m²) was lower because new individuals were of small size. The density of the target taxa was 11.6 individuals per square kilometre (*F. japonica*: 9.6 individuals per square kilometre; *F. x bohemica*: 1.6 individuals per square kilometre; *F. sachalinensis*: 0.1 individuals per square kilometre; and *F. aubertii*: 0.3 individuals per square kilometre), corresponding to an increase of 68.1 % (Table 4.1).

Table 4.1 Rate of increase, rate of extinction and rate of emergence for *Fallopia* species at the upper basin of the Orneau river in Gembloux, Belgium, 2002-2003.

	All <i>Fallopia</i> populations		<i>Fallopia aubertii</i>		<i>Fallopia japonica</i>		<i>Fallopia x bohemica</i>		<i>Fallopia sachalinensis</i>	
	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003
Rate of emergence (%)	70.1	29.2	0	0	75.8	35.2	63.6	0	0	0
Rate of extinction (%)	1.3	3.1	0	0	1.6	3.7	0	0	0	0
Rate of increase (%)	68.1	26.7	0	0	74.1	30.9	63.6	0	0	0

In 2003, *Fallopia* taxa occupied a surface of 12083 m² (mean ± s.d. = 74 ± 140 m²). This corresponds to an increase of 0.1 % with the settlement of 38 new individuals of *F. japonica*. The density of taxa turned to 14.7 individuals per square kilometre (*F. japonica*: 12.7 individuals per square kilometre; *F. x bohemica*: 1.6 individuals per square kilometre; *F. sachalinensis*: 0.1 individuals per square kilometre; and *F. aubertii*: 0.3 individuals per square kilometre) and corresponded to an increase of 26.7 % (Table 4.1). Most individuals occupied large areas as 39.6 % covered surfaces more than 10 m² of which 24.4 % occupied surfaces more than 100 m².

Three individuals of *F. aubertii* were found on enclosing walls in the urban non-industrial land use class. A single individual of *F. sachalinensis* was found near a greenhouse in the urban non-industrial land use class. For both taxa, no additional individuals appeared during the study. The most selected habitats by both *F. japonica* and *F. x bohemica* were ruderal habitats with selection index ranging from 13.0 to 13.1 and natural / semi-natural forests with selection index varying from 2.5 to 2.6. In all cases, selection index differed significantly

from 1 (Table 4.2). *Fallopia x bohemica* also selected the urban non-industrial habitats but was not the case for *F. japonica*. The other habitats were used less than expected or not used at all by both taxa.

Fallopia japonica and *F. x bohemica* also selected the border of railways, running water, and marshland more than expected (Table 4.3). In all cases, selection index differed significantly from 1 and ranged from 5.2 to 10.1. The border of roadways, stagnant water, urban industrial habitats, and farming habitats was selected by *F. japonica* more than expected but was not the case for *F. x bohemica*. *Fallopia x bohemica* used the border of meadow, exotic plantation, and natural / semi-natural forests more than expected but was not the case for *F. japonica*. The border of other habitats was not selected by both taxa. Seventy per cent of *F. japonica* individuals and 100 % of *F. x bohemica* individuals were situated along the border of the habitat types.

An important percentage of individuals occurred within buffers of 5 m along the border of communication routes in 2001: 66.3 % (rivers: 13.0 %; roadways: 36.4 %; railways: 16.9 %), in 2002: 58.4 % (rivers: 10.0 %; roadways: 31.5 %; railways: 16.9 %), in 2003: 53.0 % (rivers: 8.5 %; roadways: 26.2 %; railways: 18.3 %), whereas the total area covered by those buffers represented only 7.9 % of the landscape area (Figure 4.3). Most of the individuals were situated within buffers of 10 m along the border of communication routes in 2001: 91.0 % (rivers: 20.8 %; roadways: 49.4 %; railways: 20.8 %), in 2002: 65.3 % (rivers: 13.8 %; roadways: 36.9 %; railways: 14.6 %), in 2003: 56.7 % (rivers: 11.6 %; roadways: 33.5 %; railways: 11.6 %), whereas the total area covered by those buffers represented only 14.5 % of the landscape area.

Table 4.2 Sample sizes (*No.*) and selection indices for *Fallopia japonica* and *Fallopia x bohemica* for the different habitat types at the upper basin of the Orneau river in Gembloux, Belgium, 2001-2003. Selection indices were calculated each year for each species as $B_i = [(n_i / N) / (S_i / S)]$ and n_i is the surface occupied by the individuals of the taxon in the i^{th} habitat, N the surface occupied by all individuals of the taxon, S_i the surface occupied by the i^{th} habitat and, S the total surface of the landscape studied. If habitat use is random, the expected value of B_i will be 1.0 for each habitat type. Significant departures from 1.0 indicate that use is selective. We used chi-square analyses to determine which habitats are used more or less than would be expected under random distribution of individuals by comparing use of each habitat type to its availability. Habitats used more than expected are marked with a superscript asterisk ($P = 0.000$).

Habitat type	<i>No.</i>	Both <i>Fallopia</i> populations			<i>No.</i>	<i>Fallopia japonica</i>			<i>No.</i>	<i>Fallopia x bohemica</i>		
		2001	2002	2003		2001	2002	2003		2001	2002	2003
Natural/semi-natural forest	8	2.6*	2.5*	2.5*	7	2.7*	2.6*	2.6*	1	2.4*	2.3*	2.3*
Exotic plantation	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Lawn	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Meadow	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Orchard	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Farming	1	0.0	0.0	0.0	1	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Ruderals	144	13.0*	13.1*	13.1*	129	13.4*	13.5*	13.5*	15	11.6*	11.7*	11.7*
Urban non-industrial	7	0.4	0.4	0.4	5	0.1	0.2	0.2	2	1.2*	1.1*	1.1*
Urban industrial	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Marshland	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Stagnant water	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Running water	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Roadways	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Railways	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0

Table 4.3 Sample sizes (*No.*) and selection indices for *Fallopia japonica* and *Fallopia x bohemica* along the border of the different habitat types at the upper basin of the Orneau river in Gembloux, Belgium, 2001-2003. Selection indices were calculated each year for each species as $B_i = [(n_i / N) / (P_i / P)]$ and n_i is the surface occupied by the individuals of the taxon in the i^{th} habitat, N the surface occupied by all individuals of the taxon, P_i the perimeter of the i^{th} habitat and, P the total the perimeter of the landscape studied. If habitat use is random, the expected value of B_i will be 1.0 for each habitat type. Significant departures from 1.0 indicate that use is selective. We used chi-square analyses to determine which habitats are used more or less than would be expected under random distribution of individuals by comparing use of each habitat type to its availability. Habitats used more than expected are marked with a superscript asterisk ($P = 0.000$).

Habitat type	<i>No.</i>	Both <i>Fallopia</i> populations			<i>No.</i>	<i>Fallopia japonica</i>			<i>No.</i>	<i>Fallopia x bohemica</i>		
		2001	2002	2003		2001	2002	2003		2001	2002	2003
Natural/semi-natural forest	5	0.5	0.5	0.5	3	0.0	0.0	0.0	2	2.3*	2.3*	2.3*
Exotic plantation	3	3.4*	3.3*	3.3*	1	0.9	0.9	0.9	2	12.5*	12.4*	12.4*
Lawn	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Meadow	1	0.7	0.6	0.6	0	0.0	0.0	0.0	1	3.1*	3.1*	3.1*
Orchard	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Farming	21	1.0*	1.2*	1.2*	21	1.3*	1.6*	1.6*	0	0.0	0.0	0.0
Ruderals	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
Urban non-industrial	5	0.2	0.1	0.1	5	0.2	0.2	0.2	0	0.0	0.0	0.0
Urban industrial	2	1.3*	1.3*	1.3*	2	1.7*	1.6*	1.6*	0	0.0	0.0	0.0
Marshland	8	10.1*	9.8*	9.9*	7	10.2*	9.8*	9.9*	1	9.8*	9.7*	9.7*
Stagnant water	2	1.5*	1.4*	1.4*	1	1.8*	1.7*	1.7*	1	0.4	0.4	0.4
Running water	12	6.7*	6.6*	6.6*	9	4.7*	4.7*	4.7*	3	14.1*	13.9*	13.9*
Roadways	26	1.1*	1.2*	1.2*	24	1.1*	1.2*	1.2*	2	1.2	1.2	1.2
Railways	36	5.3*	5.2*	5.2*	30	7.0*	6.0*	6.1*	6	2.0*	1.8*	1.8*

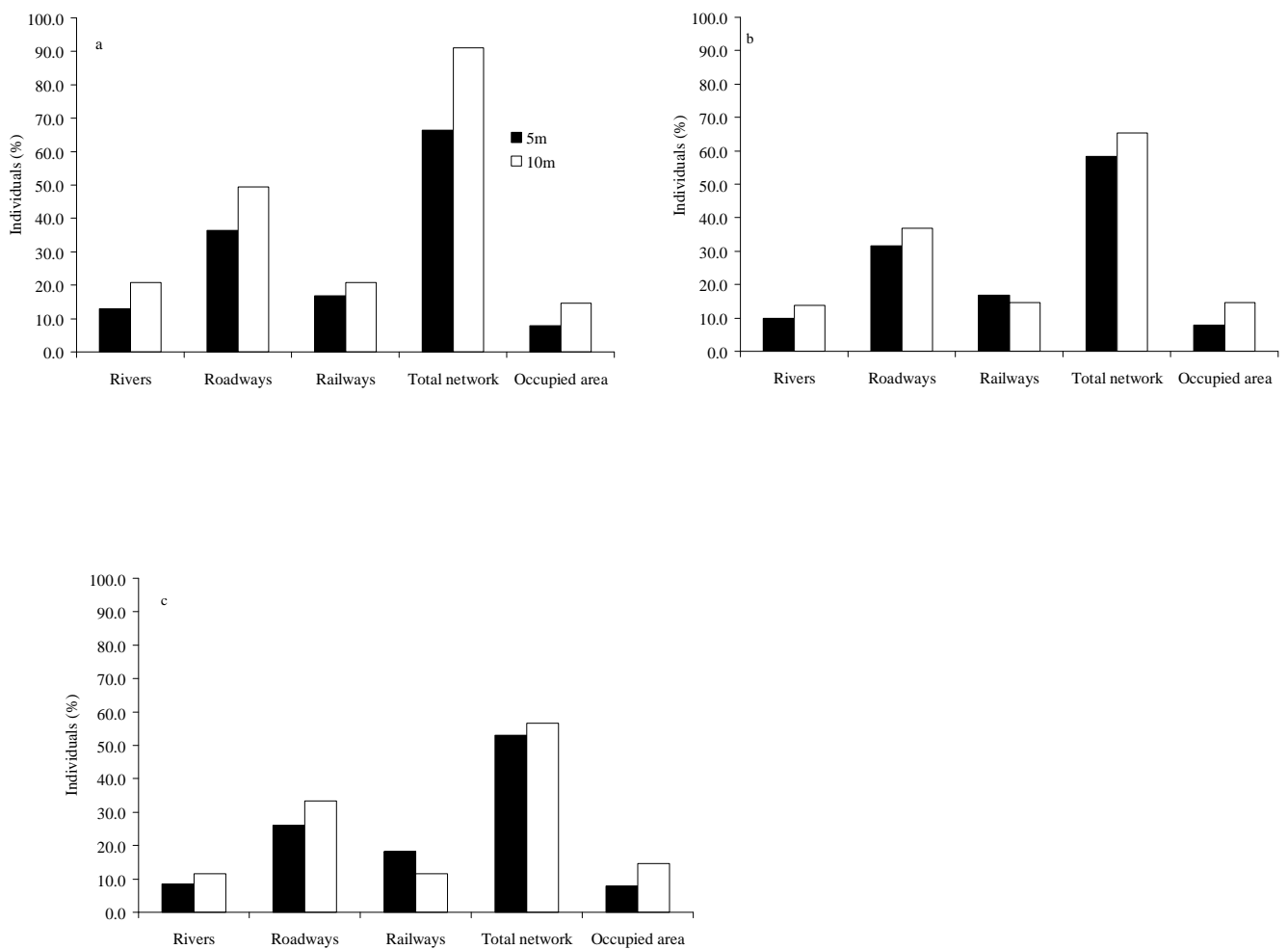


Fig. 4.3 Percentages of *Fallopia* individuals occurring within buffers of 5 m and 10 m around rivers, roadways and railways at the upper basin of the Orneau river in Gembloux, Belgium, 2001-2003 and percentage of area covered by these linear networks in the landscape unit. (a) 2001. (b) 2002. (c) 2003.

4.3.2. Dynamics of *Fallopia* populations

In 2002, the rate of emergence of individuals (70.1 %) far exceeded the rate of extinction of individuals (1.3 %). There was substantial variation in the rates of increase of density between the two study years, particularly for *F. x bohémica* (Table 4.1). The dynamics of spread of *Fallopia* taxa was mainly due to apparition of new individuals within already colonized

patches. Indeed, the rate of colonization of new habitat patches was low, mainly resulting from the dynamics of spread of *F. japonica*. In 2001, individuals of *F. japonica* and *F. x bohemica* occurred in 38 and 9 habitat patches, respectively (Table 4.4). In 2002, we recorded a colonization rate of new habitat patch of 4.3 % with two habitat patches settled by *F. japonica* (one farming and one urban non-industrial habitat patches) and one by *F. x bohemica* (one ruderal habitat patch). In 2003, this rate turned into 2.1 % with three habitat patches colonized by *F. japonica* (two ruderals and one natural / semi-natural forest habitat patches). Visual observations showed that these colonizations were likely to result mainly from clonal propagation of individuals from one occupied patch to another adjacent patch. The nearest individual was at a minimum distance of 10 m from one ruderal habitat patch and at a maximum distance of 105 m to another ruderal habitat patch.

Table 4.4 Number of occupied habitat patches, number of extinct patches and number of colonized patches for *Fallopia* species at the upper basin of the Orneau river in Gembloux, Belgium, 2001-2003.

	All <i>Fallopia</i> populations			<i>Fallopia aubertii</i>			<i>Fallopia japonica</i>			<i>Fallopia x bohemica</i>			<i>Fallopia sachalinensis</i>		
	2001	2002	2003	2001	2002	2003	2001	2002	2003	2001	2002	2003	2001	2002	2003
Number of occupied habitat patches	46	48	50	3	3	3	38	39	41	9	10	10	1	1	1
Number of extinct patches	–	1	1	–	0	0	–	1	1	–	0	0	–	0	0
Number of colonized patches	–	3	3	–	0	0	–	2	3	–	1	0	–	0	0

The detailed analysis of the dynamics of growth of *Fallopia* individuals along a high traffic roadway identified thirty-one individuals of *F. japonica*, measuring in total 137.5 m long, in September 2001. This corresponded to 2.29 % of the length of the studied segment. The mean length of individuals was (mean \pm s.d.) 4.0 ± 4.1 m, ranging from 0.1 to 15.0 m (Table 4.5). In May 2002, July 2003, and August 2003 the mean length of individuals turned into 4.6 ± 4.8 m, 5.4 ± 4.9 m, and 5.7 ± 4.9 m, respectively, ranging from 0.1 to 15.8 m, 0.1 to 17.7 m and 0.1 to 18.0 m, respectively, and corresponding to rates of growth of 20.1 ± 31.4 %, $73.8 \pm$

256.7 %, and 93.8 ± 272.1 %. Three new individuals were settled (two individuals in July 2003 and 1 individual in August 2003) and two stands merged in July 2003. The rate of death was nil. The two new individuals of July 2003 were distant from a previously established individual stand about three meters and the individual of August 2003 was far from another about 15 m.

Table 4.5 Mean length of individuals, mean measure of growth, number of emerged individuals, number of extinct individuals and number of merging of individuals for *Fallopia japonica* individuals along the national 4 at the upper basin of the Orneau river in Gembloux, Belgium, 2001-2003. Standard deviations are given in brackets.

	September 2001	May 2002	July 2003	August 2003
Mean length of individuals (m)	4.0 (4.1)	4.6 (4.4)	5.4 (4.9)	5.7 (4.9)
Mean measure of growth (%)	–	20.1 (31.4)	73.8 (256.7)	93.8 (272.1)
Number of emerged individuals	–	0	2	1
Number of extinct individuals	–	0	0	0
Number of merging of individuals	–	0	1	0

4.4. Discussion

We examined habitat selection of *F. japonica* and *F. x bohemica* with two complementary approaches: at the patch scale and along patch edges. We used this approach because a large proportion of *Fallopia* individuals were situated at the edge of habitat patches where conditions may be different than in patch core. The two approaches provided different but complementary information on habitat selection. Anyway, *F. japonica* and *F. x bohemica* exhibited a similar pattern of habitat selection whatever the approach used. Results drawn from the patch analysis were consistent with our hypothesis that *Fallopia* spp. colonize preferentially disturbed areas, with ruderal habitat the most selected. However, high level of disturbance seemed to hamper colonization by the species. Farmland where crop cultivation

induced yearly soil and vegetation disturbance were not selected by the species. High level of perturbation may preclude the establishment of those perennials taxa but we should also consider a potential role of herbicide use. Results drawn from the edge analysis underlined the importance of aquatic and humid habitats in the pattern of distribution of the species. When present, edges of those habitats were highly selected.

The detailed analysis of the distribution of *Fallopia* taxa along the linear networks showed that the majority of individuals (91,0%) in 2001 were situated within a buffer of 10 m along communication routes, which promotes the possibility of dispersion and expansion in adjacent habitat patches. The assessment of growth of *Fallopia* individuals along a high traffic highway connected to the study landscape showed high rate of growth. This pointed to the importance of linear landscape structure in the invasion dynamics of *Fallopia* taxa. However, our data did not allow us to test for a potential relation between linear networks, especially roads and habitat types. As a result, we could not assess whether habitat selection and effect of road network were totally independent. It may be that ruderal habitats were more often associated to roads than were other habitats.

Examination of species dynamics at the landscape scale did not support our hypothesis on 1) the importance of sexual reproduction in the invasion dynamics of *Fallopia* and 2) the advantage of *F. x bohemica* on *F. japonica*, due to a combination of vegetative and sexual reproduction. In the study landscape, the dynamics of spread of the taxa was high within colonized patches while the dynamics of colonization of new patches was low.

Extension within patches was most probably due to clonality. All the new individuals found were tall and did not seem to derive from seedlings. In addition, no new *F. x bohemica* settled in the close vicinity of *F. japonica*. This should be the case if seedling emergence was the cause of spread, as all the seeds produced by *F. japonica* are hybrids (Tiébré et al. 2007). The high potential for vegetative multiplication has long be considered responsible for the

dynamics of spread of *Fallopia* taxa in their introduced range (Bímová et al. 2003, Mandák et al. 2004) but this view has been challenged recently on the North American continent where hybridization has probably proceeded further than on the European continent (Gammon et al. 2007, Grimsby et al. 2007). The high rate of spread was also due to the low extinction rates observed. Pyšek et al. (2001) demonstrated that some individuals of *Fallopia* could persist for more than a century at a same site.

Previous studies have demonstrated the restoration of sexual reproduction in *F. japonica* in Belgium, despite its male-sterility. *Fallopia japonica* clones produced numerous viable hybrid seeds originating from crosses with other parental *Fallopia* species or backcrosses with *F. x bohemica* (Tiébré et al. 2007). High genotypic diversity in *F. x bohemica* suggested that most adult hybrids observed in Belgium originated from sexual reproduction (Tiébré et al. 2007). Propagule pressure at the landscape scale may be high. In the study landscape, *F. japonica* clones produced on average about 2000 seeds / m² (Tiébré et al. 2007). Taking into account the surface colonized by *F. japonica*, the seed rain over the landscape may be estimated to 14×10^6 seeds. Despite most of those wind-dispersed seeds landed in the close vicinity of the parents, dispersal over habitat patch limit has been shown to be significant, albeit at low frequency (Tiébré et al. 2007). Considering this high potential for hybrid seed production, a puzzling observation of the present study was that landscape survey did not indicate higher dynamics of establishment for *F. x bohemica* plants as compared to *F. japonica*. This suggested that conditions for seedling establishment might be very restrictive. Nevertheless, only a small proportion of seeds need to develop in adult to enhance the regeneration potential of the *Fallopia* complex. A low proportion of seedling establishment as compared to massive seed production is common in plants. Our results were in contradiction with Pyšek et al (2003) who showed a higher invasive dynamics of *F. x bohemica* over the Czech Republic and argued it should be due to the combination of sexual and vegetative reproduction, higher

vegetative growth, and genotypic diversity of the hybrids. The differences between the two studies probably arose from different spatial and temporal scales, and from differences in methodology, the Czech study being based on herbarium while we used direct field surveys. The reasons why seeds do not establish at high frequency may include selection against unbalanced hybrids, effect of winter on seed viability, competition with native vegetation, predation (Tiébré et al. 2007).

4.5. Conclusions

In light of management priorities for invasion control and habitat protection, this study explored the habitat selection and the dynamics of distribution of four invasive alien clonal plants of the genus *Fallopia*. By providing a better habitat for those taxa, disturbed habitats are susceptible areas for establishment and spread of *Fallopia* taxa. It is stressed that under the assumption of habitat destruction, fragmentation, and short-term disturbance, disturbed habitats would play an important role in the distribution of invasive alien *Fallopia* taxa. In terms of dynamics of distribution, the rates of colonization of new habitat patches were lower while the rates of expansion of existing individuals within habitat patches were higher. Our results point to importance to manage disturbed habitats and ecosystems to prevent invasions by exotic alien taxa.

Annexes



© Béatrice Lagrange

Anexe 4.1 Une population de *Fallopia japonica* en lisière de forêt.



© Béatrice Lagrange

Anexe 4.2 Deux populations de *Fallopia japonica* le long d'un parking.



© Béatrice Lagrange

Anexe 4.3 Une population fauchée de *Fallopia japonica* le long du chemin de fer.



© Béatrice Lagrange

Anexe 4.4 Une population de *Fallopia japonica* en bordure de la Meuse.



Anexe 4.5 Deux populations de *Fallopia japonica* en bordure d'un champ de betterave.



Anexe 4.6 Quelques pieds de *Fallopia japonica* dans un champ de betterave.



Anexe 4.7 Une population de *Fallopia japonica* à l'intérieur d'une clôture.

Chapitre 5 : Discussion générale

Ce travail a permis d'acquérir des connaissances sur divers aspects de l'évolution, la reproduction, la dynamique des populations des espèces, non-indigènes, invasives du genre *Fallopia* (les renouées du Japon) en Belgique. Cette étude complète les informations déjà disponibles sur la stratégie de régénération de ces espèces. Ces informations peuvent servir à promouvoir le développement de stratégies de gestion intégrée des renouées non-indigènes pour le contrôle de l'invasion et la protection des habitats. Les différents chapitres se sont intéressés à plusieurs composantes de la biologie des populations des espèces invasives: l'hybridation et ses conséquences évolutives (Chapitre 2), le succès reproducteur et la capacité de dispersion spatio-temporelle (Chapitre 3), ainsi que la distribution à l'échelle du paysage et la dynamique de colonisation des taches d'habitats (Chapitre 4). Dans ce chapitre de conclusions, ces différents éléments seront intégrés et analysés en les replaçant dans le contexte général de la thèse et discutés en relation avec le succès invasif des renouées non-indigènes. Cette discussion est aussi l'occasion de fournir des pistes de réflexion pour les priorités de gestion et les mesures préventives.

5.1. L'hybridation et ses conséquences évolutives

L'hybridation est reconnue comme une force évolutive importante (Abbott 1992, Ellstrand and Schierenbeck 2000, Rieseberg and Wendel 2004). L'hybridation couplée à la polyploïdisation peut induire la diversification et la spéciation chez les plantes non-indigènes avec des conséquences génétiques, épigénétiques et phénotypiques importantes (Comai et al.

2000, Wendel 2000, Ozkan et al. 2001, Campbell 2004, Rieseberg and Wendel 2004, Soltis et al. 2004, Salmon et al. 2005). Il peut en résulter, notamment :

- (1) Des altérations génomiques dynamiques au niveau de la structure des chromosomes et de leur fonction (Wendel 2000, Liu and Wendel 2003) ;
- (2) Une augmentation de la diversité génétique avec la création de populations génétiquement et morphologiquement distinctes dans lesquelles les flux de gènes, les assortiments chromosomiques et les recombinaisons peuvent produire de nouveaux génotypes et phénotypes (Ellstrand and Schierenbeck 2000, Doyle et al. 2004, Soltis et al. 2004, Hails and Morley 2005);
- (3) Des hybrides présentant une meilleure fitness que les espèces parentales dans le nouvel environnement (Barton 2001, Arnold et al. 2004, Lexer et al. 2004, Petit et al. 2004, Hails and Morley 2005).

Différents cas d'études ont établi le rôle de l'hybridation durant le processus d'invasion (Ellstrand and Schierenbeck 2000, Grosholz 2002, Hänfling and Kollmann 2002, Lee 2002, Müller-Schärer et al. 2004, Bleeker et al. 2007). Les exemples bien connus de création d'hybrides plus adaptés ayant une meilleure fitness sont *Spartina anglica* et *Senecio cambrensis*, tous deux originaires du Pays de Galles en Angleterre (Ferris et al. 1997, Ainouche et al. 2003, Abbott and Lowe 2004, Salmon et al. 2005), *Senecio eboracensis*, originaire de la région de York en Angleterre (Abbott and Lowe 2004), *Tragopogon mirus* et *T. miscellus*, tous deux originaires de l'Etat de Washington aux Etats Unis (Soltis et al. 2004).

L'étude, grâce aux marqueurs morphologiques, cytologiques et génétiques du patron d'hybridation et de la variation génétique et morphologique (Chapitre 2) au sein des populations de *Fallopia* non-indigènes et invasifs, en Belgique, nous a permis d'apporter des informations sur l'étendue de l'hybridation et la diversité génotypique et morphologique au sein de ce complexe d'espèces. Nous avons démontré l'occurrence d'hybridation

interspécifique et de polyploïdisation, la restauration de la reproduction sexuée et la création d'hybrides génétiquement et morphologiquement distincts des espèces parentales qui présentent une variation génotypique élevée. En Belgique, cinq taxons non-indigènes du genre *Fallopia* ont été décrits dans la flore: les quatre taxons érigés, pérennes et rhizomateux, *F. japonica*, *F. sachalinensis*, *F. japonica* var. *compacta* et *F. x bohemica*, l'hybride entre *F. japonica* et *F. sachalinensis*, ainsi que la liane pérenne *F. aubertii* (Lambinon et al. 2004). *Fallopia japonica* var. *compacta* y est mentionné comme rare et *F. x bohemica* est présenté comme un hybride d'origine horticole assez rare à rare. Dans le cadre de cette étude, nous avons démontré qu'au moins quatre taxons avec différents niveaux de ploïdie participent au processus d'hybridation en Belgique: *F. japonica* ($2n = 88$), *F. sachalinensis* ($2n = 44$), *F. aubertii* ($2n = 20$) et l'hybride *F. x bohemica* ($2n = 44$ à 88 , l'hexaploïde $2n = 66$ est le plus fréquent). Nous n'avons pas échantillonné dans la partie Nord de la Belgique, où d'autres taxons peuvent être présents. Néanmoins, l'échantillonnage entrepris dans la partie centrale et occidentale de Belgique nous permet de discuter de l'étendue de l'hybridation au sein de ce complexe de plantes et de ses conséquences sur le plan de la variation morphologique et génétique.

L'espèce non-indigène *Fallopia japonica* est octoploïde (Chapitre 2) et seul le clone mâle-stérile (Chapitre 3) a été introduit en Belgique. *Fallopia japonica* est représenté par un seul et même clone et présente une diversité génotypique faible. Cette situation a aussi été observée chez les populations de *F. japonica* en Grande Bretagne (Hollingsworth et al. 1998, Hollingsworth and Bailey 2000b) et en République tchèque (Mandák et al. 2005). Dans les autres régions d'Europe continentale comme la France (Schnitzler 2002), les données existent en ce qui concerne le niveau de ploïdie ($2n = 88$, également), mais aucune étude moléculaire n'a été entreprise en vue de statuer sur la variation génotypique et la nature clonale exceptionnelle de *F. japonica*. En Allemagne et en Suisse, l'étude du patron d'hybridation et

de ses conséquences pour la variation morphologique et génétique est en cours (Krebs et al. Données non publiées) et les résultats préliminaires montrent que *F. japonica* est également octoploïde et monoclonal. Si cela s'avère exact, l'on serait en présence d'un taxon géant à l'échelle européenne. Des études récentes de diversité génétique entreprises aux Etats Unis ont montré que, contrairement à ce qui est rapporté en Europe, *F. japonica* présente des niveaux modérés de diversité génétique (index de diversité de Simpson D varie entre 0.69 et 0.88), avec des individus mâles-stériles et femelles et les populations semblent provenir d'un mélange de reproduction sexuée et végétative (Gammon et al. 2007, Grimsby et al. 2007). *Fallopia japonica* présente cependant des individus ayant une grande variabilité morphologique (Chapitre 2). Les coefficients de variation des caractères morphologiques calculés (CV) se situent entre 8 % et 268 %. Le caractère qui présente la plus grande variabilité ($CV = 268$ %) est la hauteur de la corde (hauteur située entre la base de feuille et le point d'insertion du pétiole); Le ratio de la largeur basale sur la hauteur de la feuille est le caractère qui présente une variation morphologique beaucoup moins importante ($CV = 8$ %). Etant donné la diversité génotypique faible observée, la variation morphologique observée peut par conséquent s'expliquer soit par une plasticité environnementale soit par une variation génétique insignifiante affectant un petit nombre de locus qui détermine l'apparence des individus.

En Belgique, *Fallopia japonica* est capable de s'hybrider en tant qu'espèce parentale mère avec d'autres taxons non-indigènes en présence comme *F. aubertii* pour donner l'hybride *F. x conollyana* à $2n = 54$ chromosomes, *F. sachalinensis* pour donner l'individu hexaploïde *F. x bohémica* et *F. x bohémica* pour générer des individus ayant un nombre chromosomique variant entre 77 et 110 chromosomes (Chapitre 3). Cela a aussi été démontré en Grande Bretagne (Bailey 1988, Bailey et al. 1996, Bailey 2001). Child et Wade (2000) ont rapporté que *F. japonica* est aussi capable de s'hybrider avec *F. japonica* var. *compacta* pour donner

un hybride à $2n = 66$ chromosomes, mais cela n'a pas été prouvé dans le cadre de notre étude car aucun échantillon de *F. japonica* var. *compacta* n'a pu être prélevé à cause de son extrême rareté en Belgique (voir Chapitre 1).

Fallopia sachalinensis est tétraploïde et est représenté, dans la zone d'échantillonnage, par deux clones: un clone mâle-fertile et un clone mâle-stérile. Une situation similaire a été observée en Grande-Bretagne (Pashley et al. 2007). Ce taxon présente une diversité génotypique faible dans la zone échantillonnée au cours de cette étude avec 2 génotypes sur 6 individus examinés. La diversité génotypique faible observée au cours de cette étude est en accord avec celle observée en Grande Bretagne (Hollingsworth and Bailey 2000b, Pashley et al. 2007). Les travaux de Pashley et al. (2007) ont mis en évidence 8 génotypes sur 31 individus examinés, mais 2 génotypes dominant l'échantillon. En République tchèque, Mandák et al. (2005) ont trouvé une diversité génotypique plus élevée (16 génotypes sur 50 individus) avec une contribution plus équilibrée sur la base de marqueurs moins polymorphes (les isozymes). Cette situation laisse à penser que l'on serait en présence d'un gradient Est-Ouest de diversité génotypique avec le nombre de clones qui augmente en allant de la Grande-Bretagne vers la République tchèque. Une analyse de la diversité génotypique à l'échelle européenne permettra de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Au cours de notre étude, nous avons démontré que *F. sachalinensis* est capable de s'hybrider avec *F. japonica* pour donner l'hybride hexaploïde *F. x bohémica* et avec *F. aubertii* pour donner un hybride avec 32 chromosomes (Chapitre 2 et 3). Cela a aussi été prouvé en Angleterre (Bailey 1988, Bailey et al. 1996, Bailey 2001) et Child et Wade (2000) ont rapporté que ce taxon est capable de s'hybrider avec *F. japonica* var. *compacta* pour donner un hybride hexaploïde à $2n = 44$ chromosomes. Ces auteurs ont conclu que l'influence de *F. sachalinensis* dans le processus d'hybridation et d'invasion ne doit pas être sous-estimée. Dans le cadre de cette étude, nous avons aussi démontré que le clone mâle-stérile de *F.*

sachalinensis est le plus représenté et la plupart des hybrides *F. x bohemica* examinés résultent principalement de rétro-croisements entre *F. x bohemica* avec *F. japonica* (Chapitre 3). Malgré le fait qu'il est un donneur de pollen pour les autres espèces de renouées non-indigènes, l'influence de *F. sachalinensis* dans le processus d'hybridation et d'invasion au sein de ce complexe de plantes en Belgique est actuellement limitée.

Fallopia aubertii est diploïde et est représenté par un seul clone hermaphrodite dans la zone étudiée (Chapitre 2). Ce taxon présente aussi une diversité génotypique faible. L'analyse de la diversité génotypique chez *F. aubertii* constitue une première estimation du genre car aucune étude moléculaire n'a été entreprise dans ce domaine à ce jour. Cette analyse suggère que *F. aubertii* résulte probablement de multiplications clonales par les horticulteurs. Il est un donneur de pollen pour *F. sachalinensis*, ce qui donne un hybride à 32 chromosomes. Il est également un donneur de pollen pour *F. japonica* avec lequel il forme l'hybride *F. x conollyana* à 54 chromosomes (Chapitre 3). L'hybride *F. x conollyana* est très fréquent dans les échantillons de graines prélevés sur *F. japonica* (Chapitre 3). En Grande Bretagne, la majorité des graines prélevées sur *F. japonica* sont aussi des graines de *F. x conollyana* (Bailey 1988, Bailey et al. 1996, Bailey 2001) et Child et Wade (2000) ont également rapporté que *F. aubertii* est capable de s'hybrider avec *F. japonica* var. *compacta* et d'être rétro-croisé avec les hybrides issus de ces trois taxons. Dans le cadre de notre étude, nous avons démontré que malgré le fait que *F. aubertii* est capable de s'hybrider avec d'autres taxons et produire des graines viables, son rôle dans le processus d'invasion est encore limité car les plantules issues de l'hybridation n'arrivent pas à s'établir dans la nature; une situation similaire à celle observée en Angleterre (Bailey 2001, 2003b).

La variété *Fallopia japonica* var. *compacta* est décrite comme une plante ornementale rare en Belgique (Lambinon et al. 2004). Dans le cadre de nos travaux, nous n'avons pas pu étudier le statut sexuel et la variation génotypique et morphologique de ce taxon. Le seul individu

identifié au départ comme étant *F. japonica* var. *compacta* s'est avéré être probablement un hybride *F. x bohemica* (Chapitre 2). Néanmoins, des études conduites en Grande Bretagne (Bailey and Stace 1992, Bailey 1994, Child and Wade 2000) ont montré que *F. japonica* var *compacta* est capable de s'hybrider avec *F. japonica*, *F. aubertii* et *F. sachalinensis* et d'augmenter ainsi la variation génotypique et le succès invasif des renouées non-indigènes. Ces auteurs suggèrent que son rôle dans le patron d'hybridation ne doit pas être négligé. Toutefois, au sortir de notre étude, nous pouvons conclure que le rôle joué par *F. japonica* var. *compacta* dans le processus d'hybridation et d'invasion en Belgique est limité.

Comme nous pouvons le constater, le potentiel d'hybridation interspécifique et d'évolution des renouées du Japon est élevé en Belgique. Cependant, nos investigations n'ont mis en évidence qu'une seule forme hybride à l'état adulte sur le terrain (Chapitre 2). Il s'agit de *Fallopia x bohemica*. L'hybride *F. x bohemica* présente différents niveaux de ploïdie qui varient du tétraploïde à l'octoploïde. En Belgique, il est représenté par des clones mâles-fertiles, et présente une grande variation morphologique et génotypique. Une diversité génotypique élevée a également été observée dans les populations de *F. x bohemica* en Grande-Bretagne et en République tchèque (Hollingsworth et al. 1998, Hollingsworth and Bailey 2000b, Mandák et al. 2005). En Grande-Bretagne, cinq génotypes ont été détectés sur 23 plants de *F. x bohemica* analysés (Hollingsworth and Bailey 2000b) et en République tchèque, Mandák et al. (2005) ont trouvé 33 génotypes sur 88 plants. L'analyse par les tests d'assignation entreprise au cours de nos travaux a montré que la majorité de ces hybrides forment des clones génétiquement distincts des espèces parentales putatives (*F. japonica* et *F. sachalinensis*) et que les autres génotypes paraissent issus de rétro-croisements avec les espèces parentales car ils présentent différents degrés de mélange de pool génique avec une contribution importante du pool génique individualisé de *F. x bohemica* (Chapitre 2).

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer cette différenciation génétique des hybrides par rapport aux espèces parents. La première est de considérer que les génotypes hybrides ont été introduits indépendamment des espèces parentales en Belgique. Dans ce cas, les flux de gènes et les rétro-croisements ont pu produire de nouveaux génotypes et augmenter la diversité génotypique chez *F. x bohémica*. La deuxième hypothèse est de considérer qu'en plus de la possibilité d'introduction multiple, la multiplication sexuée par hybridation peut être à l'origine de cette diversité génotypique et morphologique. Des études récentes ont montré que l'hybridation chez les individus polyploïdes est souvent accompagnée de changements rapides dans la structure des chromosomes avec dans le cas des marqueurs dominants une perte de fragments parentaux et une addition de nouveaux fragments (Ozkan et al. 2001, Salmon et al. 2005). Dans le cadre de notre étude, l'hypothèse des changements rapides dans la structure des chromosomes nous semble la plus probable pour expliquer la différenciation observée chez *F. x bohémica* car 16% des bandes RAPD observées sont spécifiques aux hybrides *F. x bohémica*. Des études complémentaires doivent être menées pour vérifier cette hypothèse.

Des changements évolutifs rapides ont également été observés chez les populations de blé du groupe *Aegilops-Triticum* (Ozkan et al. 2001) et chez *Spartina anglica* (Salmon et al. 2005). Chez *Spartina anglica*, les études entreprises sur des populations synthétiques ont montré que trois fragments du génome parental étaient absents chez les hybrides et 11 nouveaux fragments ont été trouvés. En ce qui concerne le groupe *Aegilops-Triticum*, deux types de mutation ont été observés: d'une part les auteurs ont observé une perte de séquence du génome d'un des deux parents et, plus rarement, un gain de nouveau fragment non détecté dans les espèces parentales. Les auteurs ont conclu que les gains de bandes résulteraient de modifications épigénétiques.

L'identification cytologique grâce aux comptages chromosomiques et à la cytométrie de flux des individus de *F. x bohemica* (Chapitre 2) a permis de mettre en évidence une prédominance des individus hexaploïdes *F. x bohemica* sur le terrain en comparaison aux autres cytotypes.

Pour mémoire, les hybrides *F. x bohemica* avec différents niveaux de ploïdie peuvent être générés de différentes manières dans la zone d'introduction (Figure 5.1). Ils peuvent résulter soit (1) d'un croisement entre un mâle-stérile *F. sachalinensis* ($2n = 44$) et un mâle-fertile *F. japonica* var *compacta* ($2n = 44$) pour donner un *F. x bohemica* ($2n = 44$) qui par doublement du nombre chromosomique donne un *F. x bohemica* ($2n = 88$), soit d'un croisement entre (2) un mâle-fertile *F. sachalinensis* ($2n = 44$) et un mâle-stérile *F. japonica* var *compacta* ($2n = 44$) qui donne un *F. x bohemica* ($2n = 44$) et qui par doublement du nombre chromosomique donne un *F. x bohemica* ($2n = 88$). Les hybrides *F. x bohemica* peuvent aussi résulter d'un croisement entre (3) un mâle-fertile *F. sachalinensis* ($2n = 44$) et un mâle-stérile *F. japonica* ($2n = 88$) pour donner l'hexaploïde *F. x bohemica* ($2n = 66$) ou d'un croisement entre (4) un mâle-fertile non réduit de *F. sachalinensis* ($2n = 44$) et un mâle-stérile *F. japonica* ($2n = 88$) pour donner un octoploïde *F. x bohemica* ($2n = 88$). Une troisième forme d'hybridation serait de croiser (5) un mâle-fertile *F. sachalinensis* ($2n = 88$) avec un *F. japonica* ($2n = 88$), cela donne un *F. x bohemica* ($2n = 88$) ou (6) de croiser un mâle-fertile *F. x bohemica* ($2n = 66$) avec les taxons en présence, comme nous l'avons montré dans le chapitre 2 et 3. Cela donne une diversité d'hybrides avec des nombres chromosomiques qui peuvent aller jusque 110 et qui résultent de croisement avec des gamètes non-réduits ou partiellement réduits de l'hexaploïde *F. x bohemica*.

L'observation, dans le cadre de cette étude, que les hexaploïdes *F. x bohemica* sont les individus les plus répandus pose la question d'une sélection différentielle des hybrides sur le terrain en faveur des hexaploïdes. Cette question a déjà été relevée dans les travaux de

Mandák et al. (2005). Dans leur étude, ces auteurs ont montré que les hexaploïdes *F. x bohemica* sont les individus les plus répandus en République tchèque, comparés aux tétraploïdes et aux octoploïdes. L'explication la plus probable, pour ces auteurs, est une sélection en faveur des individus hexaploïdes.

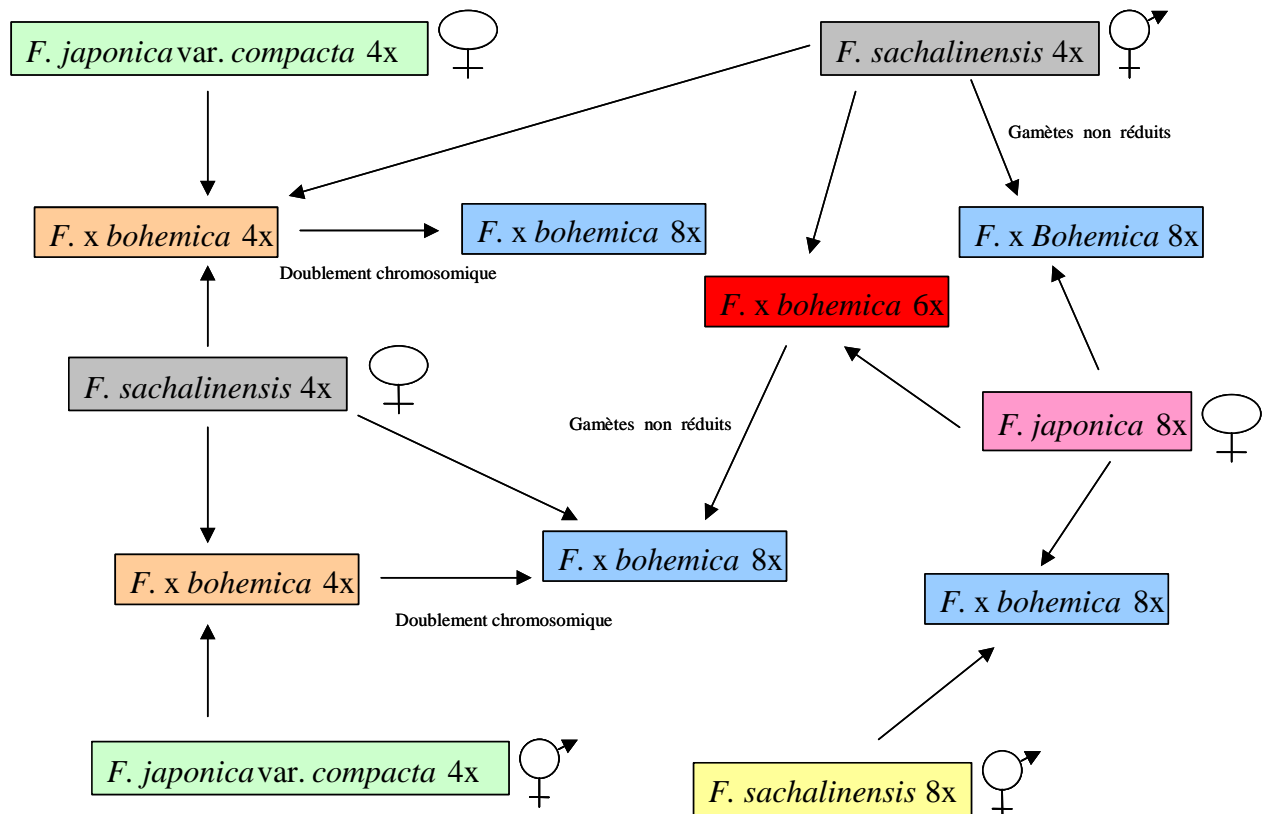


Fig. 5.1 Origines probables des différents niveaux de ploïdie de *Fallopia x bohemica* en Europe (Bailey and Wisskirchen 2006). Les morphes sexuels potentiellement présents en Belgique sont représentés par les annotations mâles et femelles.

Dans le cadre de notre étude, nous avons démontré au chapitre 3 que des graines collectées sur *F. japonica* présentent différents nombres chromosomiques: sept plantules présentent des nombres qui varient entre 44-66 et seraient des individus souffrant d'altérations mitotiques, 14 plantules proviennent de croisements avec *F. aubertii* et ont 54 chromosomes, deux plantules ont 66 chromosomes et proviennent probablement de rétro-croisements avec *F. x bohemica* et 32 plantules proviennent vraisemblablement de rétro-croisements avec *F. x*

bohemica et présentent des individus aneuploïdes avec des nombres de chromosomes variant entre 77 et 110. Au chapitre 2, l'analyse cytologique des fragments de rhizomes d'hybrides adultes rencontrés sur le terrain a montré que 26 individus sont des hexaploïdes, un individu est aneuploïde et présente des nombres de chromosomes qui varient entre 44 et 67 et trois individus sont octoploïdes. Les individus à 54 chromosomes et les aneuploïdes avec des nombres chromosomiques variant entre 77 et 110 n'ont pas été retrouvés à l'état adulte sur le terrain. Par ailleurs, les hexaploïdes, proportionnellement peu présents au niveau des plantules (2/55), sont les individus adultes les plus répandus sur le terrain (26/33). Des analyses supplémentaires doivent être menées pour comprendre à quels stades s'opère la sélection différentielle chez les plants hybrides *F. x bohemica* et surtout quels sont les facteurs qui influencent cette sélection.

Différents auteurs ont relevé l'influence des conditions environnementales sur la mortalité des hybrides dans la nature. Beerling et al. (1994), Bailey et al. (1995), et Pyšek et al. (2003) ont suggéré que la baisse des températures, à la fin du stade de la germination des graines, est responsable de la mortalité des graines hybrides dans la nature. Cependant, aucune de ces trois études n'a examiné le fait que le froid puisse sélectionner de façon différentielle certains cytotypes hybrides. Une situation analogue peut être rapportée en ce qui concerne les études entreprises par Forman et Kesseli (2003) sur la germination des graines prélevées sur *F. japonica* en Amérique du Nord. Ces auteurs ont rapporté que la disponibilité des ressources telles que la lumière, la température et l'eau influence la survie des plantules hybrides. Mais l'idée d'une sélection différentielle en faveur des hexaploïdes n'a pas été examinée. Dans notre étude, au chapitre 3, nous avons démontré que les plantules hybrides issues de la germination des graines prélevées sur *F. japonica* et *F. sachalinensis* peuvent survivre après une période hivernale, mais avec des effectifs significativement réduits. Des études complémentaires menées au sein du laboratoire (Saad et al., Données non publiées) et qui

prennent en compte des graines prélevées sur *F. japonica*, *F. sachalinensis* et *F. x bohemica*, ont suggéré une influence différente de la période hivernale sur la germination des graines issus de trois clones. Des études additionnelles qui prennent en compte les conditions environnementales et surtout la température doivent être menées pour comprendre l'effet du froid humide sur la germination des cytotypes *F. x bohemica*.

De façon alternative, d'autres études suggèrent que la sélection différentielle puisse s'opérer au niveau génétique (Bretagnolle and Thompson 1995). La polyploïdie est reconnue pour générer une fréquence élevée de gamètes non-réduits et aneuploïdes avec des conséquences pré- ou post-zygotiques (Ramsey and Schemske 1998). L'aneuploïdie peut être létale au niveau de développement des gamètes ou de l'embryon, mais peut aussi générer des gamètes euploïdes viables. Les descendants qui en sont issus sont nombreux et comprennent souvent une fréquence élevée d'individus aneuploïdes non viables (Harlan and deWet 1975). La grande variation de niveaux de ploïdie observée dans le cadre de notre étude, chez les graines et chez les adultes *F. x bohemica*, traduit l'importance des gamètes aneuploïdes dans le phénomène d'hybridation et de formation d'individus polyploïdes chez les renouées du Japon. Une étude plus fine qui examine les effets de l'aneuploïdie sur la viabilité et la fertilité des plants hybrides pourrait mettre en évidence les stades et les facteurs qui limitent l'abondance des autres cytotypes de *F. x bohemica* sur le terrain.

5.2. L'hybridation et la contribution au succès invasif

Le succès d'invasion des plantes non-indigènes a été directement associé aux traits d'histoire de vie de ces espèces végétales et plus particulièrement à leur mode de reproduction et leur capacité de dispersion (voir le chapitre 1). Les plantes invasives ont communément une grande capacité reproductive et un potentiel de régénération végétative élevé (Baker 1974,

Kolar and Lodge 2001). Les théories suggèrent que la grande variabilité génotypique engendrée par l'hybridation et les interactions entre génotype et environnement contribuent à l'adaptation et au succès invasif des hybrides formés (Song et al. 1995, Comai et al. 2000, Ellstrand and Schierenbeck 2000, Ozkan et al. 2001, Petit et al. 2004, Rieseberg and Wendel 2004, Hails and Morley 2005). Bien que reconnue comme importante, il existe très peu d'études qui ont exploré l'hybridation comme une voie pour la création de nouvelles adaptations et l'accroissement du succès invasif (Vilà et al. 2000, Abbott and Lowe 2004, Hails and Morley 2005, Bleeker et al. 2007).

Les études entreprises sur le genre *Tragopogon* aux Etats Unis ont montré que les hybrides allotétraploïdes *T. mirus* et *T. miscellus* ont atteint un niveau d'invasion tel qu'ils rivalisent et remplacent par endroits les espèces parentales diploïdes, non-indigènes et originaires d'Europe, *T. dubius* et *T. porrifolius*, et *T. dubius* et *T. pratensis*, respectivement (Soltis et al. 1995, Soltis et al. 2004). Les hybrides forment actuellement des grandes populations denses et monospécifiques et sont considérés comme des invasives largement répandues dans la région de Washington aux Etats Unis. Soltis et al. (1995) ont suggéré que les hybridations multiples et les recombinaisons chromosomiques ont joué un rôle dans l'expansion de ces hybrides aux Etats Unis. Une situation similaire a été rapportée chez les populations de *Senecio cambrensis* en Grande-Bretagne (Abbott and Lowe 2004) où cet hybride allohexaploïde récent (première collecte en 1948) est maintenant assez répandu dans le pays de Galles. Un autre exemple de succès invasif suite à un processus d'hybridation comprend l'expansion spectaculaire de *Spartina anglica* à l'échelle mondiale (Hänfling and Kollmann 2002, Petit 2004). Cet hybride allododécaploïde est issu du doublement chromosomique chez l'hybride *S. x townsendii* qui connaît une expansion très localisée en Grande-Bretagne. *Spartina anglica* est maintenant largement répandu dans les marais salants de l'Europe de l'Ouest, des Etats Unis, de l'Asie du Sud et de l'Australie (Mooney and Cleland 2001, Grosholz 2002, Ainouche et al. 2003). Ce

taxon représente, à ce jour, le seul cas d'hybridation unique ayant abouti à une invasion réussie à l'échelle mondiale (Petit 2004). Salmon et al. (2005) ont suggéré que la grande plasticité environnementale dont jouit cet hybride a joué un rôle central dans la fitness de ces populations malgré leur diversité génétique faible. D'autres exemples de succès d'invasion ont été rapportés suite à un phénomène d'hybridation intra-spécifique. Nous pouvons citer l'exemple de *Lythrum salicaria* en Amérique du Nord, d'*Echium plantagineum* en Australie et de *Tamarix* aux Etats Unis (Petit 2004). Tous ces exemples montrent que l'hybridation et les flux de gènes peuvent favoriser l'évolution rapide et l'invasion de certains taxons (Ellstrand and Schierenbeck 2000, Lee 2002, Petit 2004, Rieseberg and Wendel 2004).

L'hybride *Fallopia x bohémica*, collecté la première fois en Belgique en 1954 (Verloove 2006) a toujours été considéré comme rare et décrit comme un hybride d'origine horticole (Lambinon et al. 2004). Toutefois, l'analyse de la distribution de *F. x bohémica* en Belgique, basée sur les données cytologiques et moléculaires (Chapitre 2), nous a permis de montrer que cet hybride est maintenant largement répandu en Belgique et que sa fréquence d'occurrence dépend des régions. Dans certaines régions comme Bruxelles-Capitale, il représente le taxon dominant et dans d'autres régions comme le Brabant Wallon, il est très peu représenté (Meerts and Tiébré In press). Une distribution étendue de *F. x bohémica* a aussi été rapporté en Grande Bretagne (Bailey et al. 1996, Bailey and Wisskirchen 2006) et en République tchèque (Mandák et al. 2004). Dans les autres pays comme la France, l'Allemagne, l'Italie, la Pologne et la Suède, les données de distribution existent mais elles sont incomplètes et sont souvent limitées à une région donnée ((Bailey and Wisskirchen 2006). En République tchèque, les travaux de Bímová et al. (2003) ont montré en outre que l'hybride *F. x bohémica* présente un taux de multiplication végétative élevé comparé aux espèces parentales. Selon Pyšek et al. (2003), cette grande capacité de régénération végétative, couplée à la nature hybride, peut expliquer l'invasion de *F. x bohémica* à l'échelle régionale.

En Belgique, nous avons émis deux hypothèses pour expliquer l'expansion des renouées hybrides. La première hypothèse est de considérer que l'hybride a toujours été présent en Belgique mais la difficulté des botanistes à l'identifier sur le terrain a peut être amené à le confondre avec *F. japonica*. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de l'analyse statistique que nous avons réalisée sur les données morphologiques des renouées du Japon (Chapitre 2). Cette étude a relevé qu'aucune confusion n'est possible sur le terrain en ce qui concerne *F. sachalinensis* et *F. aubertii*. Ces deux taxons sont parfaitement distinguables, l'un pour ses très grandes feuilles poilues et l'autre pour ses très petites feuilles et sa morphologie grimpante. *Fallopia x bohémica*, quant à lui, est très proche morphologiquement de *F. japonica*. Seul le caractère cordiforme à la base des feuilles de *F. x bohémica* et la présence de poils courts sur la face extérieure permettent de différencier ces deux taxons. L'hypothèse d'une mauvaise identification des hybrides a aussi été avancée par Bailey et Wisskirchen (2006). Dans une étude récente de la distribution de *F. x bohémica* à l'échelle européenne, ces deux auteurs ont remarqué que des données de distribution étaient manquantes dans certaines régions. Ils ont argumenté cette disparité par une évolution différentielle des hybrides en fonction des régions ou une incapacité des naturalistes à identifier ce taxon sur le terrain. Seules des études moléculaires portant sur les échantillons d'herbiers peuvent apporter sans doute des éléments de réponse.

La deuxième hypothèse est de considérer que nous sommes en présence d'une invasion récente de *F. x bohémica* non encore documentée dans la flore belge. Cette hypothèse est très difficile à argumenter. En effet, nous avons démontré, d'une part, que les événements de recrutement (germination de graine et établissement de plantule) ne sont pas observés dans la nature (Chapitre 3), la banque de graine des renouées du Japon, transitoire, ne permet pas de maintenir un potentiel de colonisation par les individus hybrides à long-terme (Chapitre 3) et la dynamique de distribution de *F. x bohémica* dans le paysage, i.e. le taux d'accroissement

des individus dans les taches d'habitats colonisés et le taux de colonisation de nouvelles taches d'habitats, est inférieure à la dynamique de distribution de *F. japonica* (Chapitre 4), malgré la pression de propagules hybrides élevée (Chapitre 3). Nous avons démontré, d'autre part, la présence d'hybrides *F. x bohémica* génétiquement distincts des espèces parentales dans la nature et qui présentent une diversité génotypique élevée, suggérant que des établissements de plantules ont bien lieu (Chapitre 2). Ces arguments mis en ensemble laissent à penser que la germination des graines et l'établissement des plantules sont rares dans la nature et se produisent à très faible fréquence, comparés à la pluie de graines importante (Chapitre 3). Ce faible recrutement de plantules est toutefois suffisant pour permettre une expansion rapide de *F. x bohémica* en Belgique. L'hypothèse d'une invasion récente de *F. x bohémica*, suite à l'hybridation et à un rare recrutement de plantules dans la nature, a aussi été adoptée en République tchèque (Pyšek et al. 2003, Mandák et al. 2004, Mandák et al. 2005). Des études complémentaires doivent être menées pour connaître les conditions optimales de germination et d'établissement des plantules de *F. x bohémica*. Soltis et al. (2004) ont observé des taux de mortalité élevés chez les plantules hybrides de *Tragopogon mirus* et *T. miscellus*. Une situation similaire a été rapportée chez les plantules hybrides de *Senecio cambrensis* (Abbott and Forbes 2002).

Trois arguments ont été avancés pour expliquer les taux de mortalité des nouveaux hybrides formés. Le premier argument stipule que les plantules qui ne sont pas écologiquement différenciées des plantes-mères ne peuvent pas être assez compétitives à cause de l'abondance de ces dernières dans la zone de dispersion (Levin 2000). Un argument complémentaire stipule que le nombre élevé de descendants générés par les individus parents mis en relation avec l'infériorité compétitive des hybrides ne permet pas à ces derniers de coloniser des sites ouverts dans la zone de dispersion. Dans le cadre de notre étude, l'analyse de la pluie de graine observée chez deux clones de *F. japonica* (Chapitre 3) a montré que la majorité des

graines hybrides se dispersent au pied des plantes-mères. En accord avec les hypothèses émises, cette situation peut expliquer le fait que nous n'ayons pas trouvé de preuve d'établissement de plantules issues de la germination des graines autour des clones de renouées du Japon dans la nature.

Le deuxième argument suggère que les rétro-croisements entre les hybrides polyploïdes et les individus parents génèrent souvent des descendants qui présentent une fitness peu élevée et infertiles (Levin 1975, Felber 1991). Cela a été démontré chez *Senecio cambrensis* où les hybrides qui sont issus de rétro-croisements avec *S. squalidus* sont infertiles et ceux issus de rétro-croisements avec *S. vulgaris* présentent un taux de fructification bas (Ingram and Noltie 1995, Lowe and Abbott 2004). L'étude entreprise dans le cadre de cette thèse a montré que l'hybride *F. x bohémica* présente un taux de fructification nul et que la majorité des graines prélevées sur *F. japonica*, qui présentent une fitness peu élevée, proviennent de rétro-croisements avec *F. x bohémica* (Chapitre 3).

Le troisième argument émis pour expliquer la mortalité des plantules formées est l'occurrence de perturbations démographiques et environnementales qui empêchent l'établissement des plantules hybrides (Shaffer 1987, Lande 1988). En effet, l'augmentation du nombre et de la taille des populations est un pré-requis pour l'établissement et la dispersion de nouveaux taxons. Abbott and Forbes (2002) ont analysé la dispersion des populations d'hybride *Senecio cambrensis* dans la région d'Edinburgh en Angleterre. Ces auteurs ont montré que les sites favorables à la dispersion de ce taxon ont été perturbés au cours des huit années d'investigations et que ces perturbations ont probablement participé à l'extinction de ce taxon dans la région. En Belgique, l'analyse spatiale de la distribution et de dynamique de colonisation des populations de renouées du Japon que nous avons entreprise dans la commune de Gembloux (Chapitre 4) a montré que les habitats perturbés, zones de prédilections des renouées du Japon, ont connu de nombreuses perturbations avec la

construction de nouveaux bâtiments commerciaux et d'habitation et des déplacements de sol. Toutes ces perturbations ont pu créer des conditions défavorables à l'installation et/ou à la survie des plantules hybrides *F. x bohemica* sur le terrain. Des essais de germination qui prennent en compte la compétition, les perturbations démographiques et environnementales pourront mettre en évidence les conditions optimales qui favorisent la germination et l'établissement des plantules hybrides dans le paysage.

5.3. Implications et pistes de réflexion pour les priorités de gestion et les mesures préventives

La prévention, la gestion et le contrôle des espèces non-indigènes invasives sont devenus des enjeux importants (Allendorf and Lundquist 2003). Gérer et surveiller les populations d'espèces invasives demande de disposer de données, biologique, écologique, génétique et biogéographique afin de développer des stratégies de gestion intégrée (Rejmánek 1995, Sakai et al. 2001, Silvertown and Charlesworth 2001, Allendorf and Lundquist 2003, Simberloff 2003). L'hybridation est maintenant reconnue comme une force évolutive importante chez les espèces non-indigènes invasives (Abbott 1992, Ellstrand and Schierenbeck 2000, Rieseberg and Wendel 2004). Par conséquent, les mesures de gestion et de contrôle doivent prendre en compte la variabilité des caractères entre morphotypes et le rôle que joue la reproduction sexuée par hybridation dans le succès invasif des taxons (Vilà et al. 2000). Bien que loin d'être exhaustives, les connaissances développées au cours de ce travail devraient permettre de comprendre les mécanismes d'invasion des renouées du Japon et de fournir des pistes de réflexion pour des stratégies de contrôle qui prennent en compte aussi bien les modes de reproduction sexué et végétatif que les interactions génotype x environnement.

En ce qui concerne l'étendue de l'hybridation, il apparaît clairement à travers cette étude que la mise en commun de deux espèces asiatiques apparentées mais géographiquement isolées dans leur aire d'indigénat et se reproduisant principalement par voie végétative, un mâle-stérile *Fallopia japonica* et un hermaphrodite *F. sachalinensis*, a probablement créé un hybride, *F. x bohémica*. En moins d'un demi-siècle (Verloove 2006), *F. x bohémica* a augmenté son nombre de populations et est aujourd'hui largement répandu en Belgique (Chapitre 2), en Europe (Bailey and Wisskirchen 2006) et aux Etats Unis (Child and Wade 2000). Cet hybride possède une grande diversité morphologique et génotypique (Chapitre 2) et un pouvoir de régénération végétatif plus élevé que les espèces parents (Bímová et al. 2003), ce qui rend le contrôle chimique et mécanique difficile (Bímová et al. 1999). Les différences entre hybrides (*F. x bohémica* dans notre cas) et les taxons parents (*F. japonica* et *F. sachalinensis*) peuvent être à l'origine de la résistance des populations aux pratiques de gestion et de contrôle. Malheureusement à ce jour, aucune carte de distribution de l'hybride *F. x bohémica* n'a été éditée en Belgique et l'on dispose de peu d'informations sur les facteurs qui influencent la stabilité et l'expansion de *F. x bohémica*. Il apparaît donc qu'avant de faire des essais de gestion des renouées du Japon s.l., il faut identifier et cartographier les hybrides *F. x bohémica* et ensuite étudier comment l'hybridation influence l'efficacité des mesures de contrôle chimique, mécanique et biologique.

Nous avons également montré que l'hybride *F. x bohémica* est capable de se retro-croiser avec les espèces parentes. En effet, la majorité des graines produites par l'individu mâle-stérile *F. japonica* sont issus de rétro-croisements avec l'hybride *F. x bohémica* (Chapitre 3). Cela a permis la restauration de la reproduction sexuée qui manquait chez l'individu mâle-stérile *F. japonica* (Chapitre 3) et la diversité génotypique qui manquaient chez les espèces parentales (Chapitre 2). En outre, les graines formées sont capables de se disperser à plus de 16 m, laissant la possibilité de fonder de nouvelles populations génétiquement distinctes

(Chapitre 3). De fait, l'hybride *F. x bohemica* est devenu une composante majeure de la reproduction sexuée et du succès invasif des renouées du Japon en Belgique. Des mesures doivent être prises pour empêcher la floraison chez les renouées du Japon et chez *F. x bohemica* en particulier. Nos investigations ne nous ont pas permis d'identifier des plantules issues de la germination des graines sur le terrain (Chapitre 3). Les taux de germination des graines hybrides sont significativement réduits après passage au froid et la banque de graine n'est pas permanente (Chapitre 3). Dans la perspective du réchauffement climatique, des hivers doux pourraient favoriser la germination des plants hybrides sur le terrain. Il est donc important de tenir compte du facteur environnemental et surtout du réchauffement climatique dans l'élaboration de stratégies de gestion.

Enfin, l'analyse spatiale de la distribution des renouées du Japon fournit également des indications pour la gestion à l'échelle du paysage. Les résultats de la sélection d'habitats montrent que les habitats perturbés par l'homme comme les terrains vagues, les habitats rudéraux, les abords des zones linéaires (routes, chemins de fer et cours d'eau) et des forêts sont préférés par les hybrides *F. x bohemica* et les autres renouées du Japon (Chapitre 4). Ceci implique de gérer les habitats perturbés pour prévenir l'invasion par les renouées du Japon et l'hybride *F. x bohemica*. Les résultats de cette étude ont également montré que la dynamique d'expansion des individus existants dans les taches d'habitats est élevée et la dynamique de colonisation de nouvelles taches d'habitats est basse. Ces résultats suggèrent de limiter les clones existants et de gérer en priorité les habitats envahis par les renouées du Japon et l'hybride *F. x bohemica*.

5.4. Conclusions et perspectives

La multiplication végétative est reconnue comme le principal mode de reproduction et d'expansion des renouées du Japon hors de leur zone d'indigénat. Cependant, ce travail a démontré que la reproduction sexuée par hybridation et polyploïdisation apparaît aujourd'hui comme une force motrice pour l'évolution des renouées du Japon. Ce mode de multiplication restaure la diversité génotypique qui manquait dans la zone d'introduction. Cela pourrait générer des hybrides adaptés aux nouvelles conditions environnementales et plus invasifs que les espèces parentales. Il est manifeste que l'hybridation joue un rôle important dans le succès invasif des renouées du Japon en Belgique et doit être prise en considération dans les mesures de contrôle et de gestion.

Les éléments majeurs apportés par ce travail en ce qui concerne l'hybridation chez les populations des renouées du Japon et les éventuelles perspectives de recherche sont les suivants :

(1) Les hybrides *Fallopia x bohemica* forment pour la plupart des clones génétiquement distincts des espèces parentales, *F. japonica* et *F. sachalinensis*. Les autres clones hybrides paraissent issus de rétro-croisements entre *F. x bohemica* et les parents. Cette différenciation génétique résulte d'une introduction indépendante des individus hybrides ou de la multiplication sexuée par hybridation dans la zone d'introduction;

◆ Une analyse comparée de la structure des chromosomes des hybrides et des parents permettrait de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle la diversité génétique observée chez les hybrides serait due à des changements évolutifs rapides apparus dans la structure des chromosomes, suite à la

reproduction sexuée par hybridation des individus parents polyploïdes, *F. japonica* et *F. sachalinensis*.

◆ Une analyse comparée de l'ADN chloroplastique des hybrides et des parents permettrait de mieux comprendre les patrons d'hybridation interspécifique et les flux de gènes chez les renouées du Japon.

(2) Les hybrides hexaploïdes *F. x bohémica* ($2n = 66$) sont les individus les plus répandus comparées aux autres cytotypes en présence. L'abondance des hexaploïdes suggère qu'une sélection différentielle s'opère au niveau des plants hybrides;

◆ L'étude des facteurs génétiques et environnementaux qui influencent la mortalité des hybrides permettrait de comprendre à quels stades s'opère la sélection différentielle et quels sont les facteurs qui influencent cette sélection.

(3) L'analyse de la distribution spatiale des hybrides *F. x bohémica* démontre que ces taxons sont largement répandus. L'expansion des renouées hybrides résulte d'une mauvaise identification de ces taxons au début du phénomène d'invasion ou d'une invasion récente non encore documentée;

◆ Une analyse génétique des échantillons d'herbiers pourrait permettre de retracer la dynamique d'invasion des hybrides.

◆ L'étude des facteurs écologiques, génétiques et démographiques qui favorisent la germination et l'établissement des plants hybrides permettraient de connaître les conditions optimales de germination et d'établissement des renouées hybrides.

Bien que ce travail ait permis d'approfondir les connaissances en biologie des invasions des renouées du Japon, de nombreuses voies de recherches restent ouvertes et méritent d'être explorées à l'avenir.

Bibliographie

- Abbott, R. J. 1992. Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. *Trends in Ecology and Evolution* **7**:401-405.
- Abbott, R. J. 2000. Hybrid origin of the Oxford Ragwort, *Senecio squalidus* L. *Watsonia* **23**:123-138.
- Abbott, R. J., and D. G. Forbes. 2002. Extinction of the Edinburgh lineage of the allopolyploid neospecies, *Senecio cambrensis* Rosser (Asteraceae). *Heredity* **88**:267-269.
- Abbott, R. J., and A. J. Lowe. 2004. Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**:467-474.
- Ainouche, M. L., A. Baumel, A. Salmon, and G. Yannic. 2003. Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New phytologist* **161**:165-172.
- Allendorf, F. W., and L. L. Lundquist. 2003. Introduction: population biology, evolution and control of invasive species. *Conservation Biology* **17**:24-30.
- Anonyme. 2001. Etude bibliographique sur la renouée du Japon : écologie, biologie et modalité de gestion. C.P.I.E. Val d'Authie, Val d'Authie, France.
- Arafeh, R. M. H., Y. Sapir, A. Shmida, N. Iraki, O. Fragman, and H. P. Comes. 2002. Patterns of genetic and phenotypic variation in *Iris haynei* and *I. atrofusca* (Iris sect. *Oncocyclus* = the royal irises) along an ecogeographical gradient in Israel and the West Bank. *Molecular Ecology* **11**:39-53.
- Arnold, M. L., A. C. Bouck, and R. S. Cornman. 2004. Verne Grant and Louisiana irises: is there anything new under the sun? *New phytologist* **161**:143-149.
- Arthur, S. M., B. F. J. Manly, L. L. McDonald, and G. W. Garner. 1996. Assessing habitat selection when availability changes. *Ecology* **77**:215-227.
- Artyukova, E. V., A. B. Kholina, M. M. Kozyrenko, and Y. N. Zhuravlev. 2004. Analysis of genetic variation in rare endemic species *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) using RAPD markers. *Russian Journal of Genetics* **40**:710-716.
- Bailey, J. P. 1988. Putative *Reynoutria japonica* Houtt. x *Fallopia baldschuanica* (Regel) Holub hybrids discovered in Britain. *Watsonia* **17**:163-164.
- Bailey, J. P. 1989. Cytology and breeding behaviour of giant alien *Polygonum* species in Britain. PhD Thesis. University of Leicester, Leicester, UK.
- Bailey, J. P. 1994. Reproductive biology and fertility of *Fallopia japonica* (Japanese knotweed) and its hybrids in the British Isles. Pages 141-158 in L. C. De Waal, L. E. Child, P. M. Wade, and J. H. Brock, editors. *Ecology and management of invasive riverside plants*. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Bailey, J. P. 2001. *Fallopia x conollyana* the railway-yard knotweed. *Watsonia* **23**:539-541.
- Bailey, J. P. 2003a. Japanese Knotweed *s. l.* at home and abroad. Pages 183-196 in L. Child, J. H. Brock, G. Brundu, K. Prach, P. Pyšek, M. Wade, and M. Williamson, editors. *Plant invasions: ecological threats and management solutions*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Bailey, J. P. 2003b. New records for *Fallopia x conollyana*: is it truly such a rarity? *Notes Watsonia* **24**:451-453.
- Bailey, J. P., L. Child, and A. P. Conolly. 1996. A survey of the distribution of *Fallopia x Bohemica* (Chrtek & Chrtkova) J. Bailey (Polygonaceae) in the British Isles. *Watsonia* **21**:187-198.

- Bailey, J. P., L. E. Child, and M. Wade. 1995. Assessment of the genetic variation and spread of British populations of *Fallopia japonica* and its hybrids *Fallopia x bohemica*. Pages 141-150 in P. Pyšek, K. Prach, M. Rejmánek, and M. Wade, editors. Plant invasions - general aspects and specific problems. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands.
- Bailey, J. P., and A. P. Conolly. 2000. Prize-winners to pariahs - a history of Japanese knotweed s. l. (Polygonaceae) in the British Isles. *Watsonia* **23**:93-110.
- Bailey, J. P., and C. A. Stace. 1992. Chromosome number, morphology, pairing, and DNA values of species and hybrids in the genus *Fallopia* (Polygonaceae). *Plant Systematics and Evolution* **180**:29-52.
- Bailey, J. P., and R. Wisskirchen. 2006. The distribution and origins of *Fallopia x bohemica* (Polygonaceae) in Europe. *Nordic Journal of Botany* **24**:173-199.
- Baker, H. G. 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. Pages 147-169 in H. G. Baker and G. L. Stebbins, editors. The genetics of colonizing species. Academic, New York, USA.
- Baker, H. G. 1974. The evolution of weeds. *Annual review of ecology and systematics* **5**:1-24.
- Bakker, J. P., P. Poschlod, R. J. Strykstra, R. M. Bekker, and K. Thompson. 1996. Seed banks and seed dispersal : important topics in restoration ecology. *Acta Botanica Neerlandica* **45**:461-490.
- Barral, V. 1994. Biologie et biogéographie de *Polygonum cuspidatum*. Mémoire de Maîtrise. Université Joseph Fourier, Grenoble, France.
- Barrett, S. C. H., and B. C. Husband. 1990. Genetics of plant migration and colonization. Pages 254-277 in A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir, editors. Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer, Sunderland.
- Barton, N. H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* **10**:551-568.
- Bazzaz, F. A. 1986. Life history of colonizing plants: Some demographic, genetic, and physiological features. Pages 96-110 in H. A. Mooney and J. A. Drake, editors. Ecology of biological invasions of North America and Hawaii. Springer-Verlag, New York.
- Berling, D. J. 1990. The use of non-persistent herbicides, glyphosate and 2,4-D amine to control riparian stands of Japanese knotweed (*Reynoutria japonica* Houtt.). *Regulated Rivers, Research and Management* **5**:413-417.
- Berling, D. J. 1991. The effect of riparian land use on the occurrence and abundance of Japanese knotweed *Reynoutria japonica* on selected rivers in South Wales. *Biological Conservation* **55**:329-337.
- Berling, D. J., J. P. Bailey, and A. P. Conolly. 1994. Biological flora of the British Isles. *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decraene. *Journal of Ecology* **82**:959-979.
- Bímová, K. B. E., B. Mandák, and P. Pyšek. 1999. Experimental control of *Reynoutria*: a comparative study of three congeners. in G. Brundu, editor. Proceedings 5th International Conference on the Ecology of Invasive Alien Plants, Sardinia.
- Bímová, K. B. E., B. B. C. Mandák, and P. Pyšek. 2003. Experimental study of vegetative regeneration in four invasive *Reynoutria* taxa (Polygonaceae). *Plant ecology* **166**:1-11.
- Bisteau, E., and G. Mahy. 2004. Les banques de graines et leur contribution à la restauration des habitats: cas d'étude appliqué aux pelouses calcaires de Lesse et lomme. *Parcs et Réserves* **59**:57-66.
- Bleeker, W., U. Schmitz, and M. Ristow. 2007. Interspecific hybridization between alien and native plant species in Germany and its consequences for native biodiversity. *Biological Conservation* **137**:248-253.

- Blossey, B., and R. Nötzold. 1995. Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology* **83**:887-889.
- Bossdorf, O., H. Auge, L. Lafuma, W. E. Rogers, E. Siemann, and D. Prati. 2005. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* **144**:1-11.
- Boyer, M. 2002. Cartographie des renouées du Japon sur le réseau hydrographique du bassin Rhone-Méditerranée-Corse (Hors Saone-Doubs). *in* Journées techniques nationales "renouées". Association Echel, Besançon, France.
- Boyer, M. 2005. L'invasion des cours d'eau par les renouées du Japon s.l.: réflexions et propositions pour des stratégies de lutte efficaces. *Parcs et Réserves* **60**:21-29.
- Bretagnolle, F., F. Felber, F. G. Calame, and P. Küpfer. 1998. La polyploïdie chez les plantes. *Botanica Helvetica* **108**:5-37.
- Bretagnolle, F., and J. D. Thompson. 1995. Tansley review no. 78. Gamètes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New phytologist* **129**:1-22.
- Brock, J., and M. Wade. 1992. Regeneration of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) from rhizome and stems: observations from greenhouse trials. Pages 85-93 *in* IX^{ème} colloque international sur la biologie des mauvaises herbes. ANPP, Paris, France, Dijon, France.
- Brock, J. H., L. E. Child, L. C. De Waal, and M. Wade. 1995. The invasive nature of *Fallopia japonica* is enhanced by vegetative regeneration from stem tissues. Pages 131-139 *in* P. Pyšek, K. Prach, M. Rejmánek, and M. Wade, editors. *Plant invasions - General aspects and special problems*. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands.
- Brown, A. H. D., and D. R. Marshall. 1981. Evolutionary changes accompanying colonization in plants. Pages 351-363 *in* G. G. E. Scudder and J. L. Reveal, editors. *Evolution today*. Carnegie-Mellon University, Pittsburg.
- Brown, J. S., and C. G. Eckert. 2005. Evolutionary increase in sexual and clonal reproductive capacity during biological invasion in an aquatic plant *Butomus umbellatus* (Butomaceae). *American Journal of Botany* **92**:495-502.
- Bullock, J. M., and R. T. Clarke. 2000. Long distance seed dispersal by wind: measuring and modelling the tail of the curve. *Oecologia* **124**:506-521.
- Buse, A. 1988. Habitat selection and grouping of beetles (Coleoptera). *Holarctic Ecology* **11**:241-247.
- Callaway, R., and J. Maron. 2006. What have exotic plant invasions taught us over the past 20 years? *Trends in Ecology and Evolution* **21**:369-374.
- Campbell, D. R. 2004. Natural selection in *Ipomopsis* hybrid zones: implications for ecological speciation. *New phytologist* **161**:83-90.
- Cattell, M. V., and S. A. Karl. 2004. Genetics and morphology in a *Borrchia frutescens* and *B. arborescens* (Asteraceae) hybrid zone. *American Journal of Botany* **91**:1757-1766.
- Child, L., and L. de Waal. 1997. The use of GIS in the management of *Fallopia japonica* in the urban environment. Pages 207-220 *in* J. H. Brock, M. Wade, P. Pyšek, and D. F. Greene, editors. *Plant invasions: studies from North America and Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Child, L., and M. Wade. 2000. *The Japanese knotweed manual*. Packard Publishing Limited, Chichester, West Sussex.
- Child, L., M. Wade, and S. Hathaway. 2001. Strategic invasive plant management, linking policy and practise: a case study of *Fallopia japonica* in Swansea, South Wales (U.K.). Pages 291-302 *in* G. Brundu, J. Brock, I. Camarda, L. Child, and M. Wade,

- editors. Plant invasions: species ecology and ecosystem management. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Child, L. E., L. C. De Waal, M. Wade, and J. P. Palmer. 1992. Control and management of *Reynoutria* species (knotweed). *Aspects of Applied Biology* **29**:295-307.
- Christen, D., and G. Matlack. 2006. The role of roadsides in plant invasions: a demographic approach. *Conservation Biology* **20**:385-391.
- Cock, M. J. W. 1978. The assessment of preference. *Journal of Animal Ecology* **47**:805-816.
- Collingham, Y. C., R. A. Wadsworth, B. Huntley, and P. E. Hulme. 2000. Predicting the spatial distribution of non-indigenous riparian weeds: issues of spatial scale and extent. *Journal of Applied Ecology* **37 (Suppl. 1)**:13-27.
- Comai, L., A. P. Tyagi, K. Winter, R. Holmes-Davis, S. H. Reynolds, Y. Stevens, and B. Byers. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *The Plant Cell* **12**:1551-1567.
- Conolly, A. P. 1977. The distribution and history in the British Isles of some alien species of *Polygonum* and *Reynoutria*. *Watsonia* **11**:291-311.
- Cotrim, H. C., M. W. Chase, and M. S. Pais. 2003. *Silene rothmaleri* P. Silva (Caryophyllaceae), a rare, fragmented but genetically diverse species. *Biodiversity and Conservation* **12**:1083-1098.
- Craven, R. B., D. A. Eliason, D. B. Fancy, P. Reiter, E. G. Campos, W. L. Jakob, G. C. Smith, C. J. Bozzi, C. G. Moore, G. O. Maupia, and T. P. Monath. 1988. Importation of *Aedes albopictus* and other exotic mosquito species into the United States in used tires from Asia. *Journal of the American Mosquito Control Association* **4**:138-142.
- Crawley, M. J. P., P. H. Harvey, and A. Purvis. 1996. Comparative ecology of the native and alien floras of the British Isles. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **351**:1251-1259.
- Daehler, C. C. 1998. The taxonomic distribution of invasive angiosperm plants: ecological insights and comparison to agricultural weeds. *Biological Conservation* **84**:167-180.
- Daehler, C. C. 2001. Two ways to be an invader, but one is more suitable for ecology. Pages 101-102 in *The Ecological Society of America 86th annual meeting*. Bulletin of the Ecological Society of America, Monona Terrace Madison Wisconsin.
- Daehler, C. C., and D. R. Strong. 1994. Variable reproductive output among clones of *Spartina alterniflora* (Poaceae) including San Francisco Bay, California: the influence of herbivory, pollination and establishment rate. *American Journal of Botany* **81**:307-313.
- Daehler, C. C., and D. R. Strong. 1996. Status, prediction and prevention of introduced cordgrass *Spartina* spp. invasions in pacific estuaries, USA. *Biological Conservation* **78**:51-58.
- D'Antonio, C. M., and P. M. Vitousek. 1992. Biological invasions by exotic grasses, the grass-fire cycle, and the global change. *Annual review of ecology and systematics* **23**:63-87.
- Davis, M. A., J. P. Grime, and K. Thompson. 2000. Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *Journal of Ecology* **88**:371-550.
- Davis, M. A., and K. Thompson. 2000. Eight ways to be a colonizer; two ways to be an invader: a proposed nomenclature scheme for invasion ecology. *The Ecological Society of America* **81**:101-102.
- de Waal, L. C. 1995. Treatment of *Fallopia japonica* near water - a case study. Pages 203-212 in P. Pyšek, K. Prach, M. Rejmánek, and M. Wade, editors. *Plant invasions - general aspects and special problems*. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands.

- de Waal, L. C. 2001. A viability study of *Fallopia japonica* stem tissue. *Weed Research* **41**:447-460.
- Décamps, H. 2004. L'écologie du paysage ou l'ambition paysagère de l'écologie. *La Lettre de l'IFB* **5**:2pp.
- Didham, R. K., J. M. Tylianakis, M. A. Hutchison, R. M. Ewers, and N. J. Gemmill. 2005. Are invasive species the drivers of ecological change? *Trends in Ecology and Evolution* **20**:470-474.
- Dong, M., L. Bao-Rong, H.-B. Zhang, J.-K. Chen, and B. Li. 2006. Role of sexual reproduction in the spread of an invasive clonal plant *Solidago canadensis* revealed using intersimple sequence repeat markers. *Plant Species Biology* **21**:13-18.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**:13-15.
- Doyle, J. J., J. L. Doyle, J. T. Rauscher, and A. H. D. Brown. 2004. Diploid and polyploid reticulate evolution throughout the history of the perennial soybeans (*Glycine* subgenus *Glycine*). *New phytologist* **161**:121-132.
- Dukes, J. S., and H. A. Mooney. 1999. Does global change increase the success of biological invaders. *Trends in Ecology and Evolution* **14**:135-139.
- Duriez, O., Y. Ferrand, F. Binet, E. Corda, F. Gossmann, and H. Fritz. 2005. Habitat selection of the Eurasian woodcock in winter in relation to earthworms availability. *Biological Conservation* **122**:479-490.
- Eckert, C. G., K. Lui, K. Bronson, P. Corradini, and A. Bruneau. 2003. Population genetic consequences of extreme variation in sexual and clonal reproduction in an aquatic plant. *Molecular Ecology* **12**:331-344.
- Ellstrand, N. C., and M. L. Roose. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* **74**:123-131.
- Ellstrand, N. C., and K. A. Schierenbeck. 2000. Hybridisation as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? In variation and evolution in plants and microorganisms: toward a new synthesis 50 years after Stebbins. *Proceedings National Academy of Sciences* **97**:7043-7050.
- Engel, C. R., C. Daguin, and E. A. Serrão. 2006. When is a hybrid a hybrid? A counter-reply to Wallace et al. *Molecular Ecology* **15**:3481-3482.
- Esselman, E. J., L. Jianqiang, D. J. Crawford, J. L. Windus, and A. D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* **8**:443-451.
- Eunmi, L. C. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:386-391.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**:2611-2620.
- Falk-Petersen, J., T. Bøhn, and O. T. Sandlund. 2006. On the numerous concepts in invasion biology. *Biological invasions* **8**:1409-1424.
- Felber, F. 1991. Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population: effect of the relative fitness of the cytotypes. *Journal of Evolutionary Biology* **4**:195-207.
- Ferris, C., R. A. King, and A. J. Gray. 1997. Molecular evidence for the maternal parentage in the hybrid origin of *Spartina anglica* C.E. Hubbard. *Molecular Ecology* **12**:2033-2043.
- Fjellheim, S., R. Elven, and C. Brochmann. 2001. Molecules and morphology in concert. II. The *Festuca brachyphylla* complex (Poaceae) in Svalbard. *American Journal of Botany* **88**:869-882.
- Fojcik, B., and B. Tokarska-Guzik. 2000. *Reynoutria x bohémica* (Polygonaceae) - nowy takson we florze Polski. *Fragmenta floristica et geobotanica Polonica* **7**:63-71.

- Forman, J., and R. V. Kesseli. 2003. Sexual reproduction in the invasive species *Fallopia japonica* (Polygonaceae). *American Journal of Botany* **90**:586-592.
- Forman, R. T. T., and L. E. Alexander. 1998. Roads and their major ecological effects. *Annual review of ecology and systematics* **29**:207-231.
- Forman, R. T. T., and M. Godron. 1986. *Landscape Ecology*. John Wiley and Sons, New York.
- Fox, M. D. 1990. Mediterranean weeds: exchanges of invasive plants between the five Mediterranean regions of the world. *in* F. Di Castri, A. J. Hansen, and M. Debussche, editors. *Biological invasions in Europe and the Mediterranean basin*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Fox, M. D., and B. J. Fox. 1986. The susceptibility of natural communities to invasion. Pages 57-66 *in* R. H. Groves and J. J. Burdon, editors. *Ecology of biological invasions*. Cambridge University Press, New York.
- Gabrielsen, T. M., and C. Brochmann. 1998. Sex after all: high levels of diversity detected in the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* using RAPD markers. *Molecular Ecology* **7**:1701-1708.
- Gaillard, V., J. B. Voinot, and A. Solviche. 2002. Expérimentation de méthodes de régulation non chimique des renouées du Japon. *in* Journées techniques nationales "renouées". Association Echel, Besançon, France.
- Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma, and E. Firoozabadi. 1983. Rapid flow cytometry analysis of the cell cycle in plant tissue. *Science* **220**:1049-1051.
- Gammon, M. A., J. L. Grimsby, D. Tsirelson, and R. V. Kesseli. 2007. Molecular and morphological evidence reveals introgression in swarms of the invasive taxa *Fallopia japonica*, *F. sachalinensis*, and *F. x bohemica* (Polygonaceae) in the United States. *American Journal of Botany* **94**:948-956.
- Gaskin, J. F., and B. A. Schaal. 2002. Hybrid *Tamarix* widespread in U.S. invasion and undetected in native Asian range. *Proceedings National Academy of Sciences* **99**:11256-11259.
- Godefroid, S. 1996. A propos de l'extension spectaculaire de *Fallopia japonica*, *F. sachalinensis*, *Buddleja davidii* et *Senecio inaequidens* en région bruxelloise. *Dumotiera* **63**:9-16.
- Green, R. E. 1997. The influence of numbers released on the outcome of attempts to introduce exotic bird species to New Zealand. *Journal of Animal Ecology* **66**:25-35.
- Grimsby, J. L., D. Tsirelson, M. A. Gammon, and R. V. Kesseli. 2007. Genetic diversity and clonal vs. sexual reproduction in *Fallopia* spp. (Polygonaceae). *American Journal of Botany* **94**:957-964.
- Grosholz, E. 2002. Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:22-27.
- Grotkopp, E., M. Rejmánek, and T. Rost. 2002. Towards a causal explanation of plant invasiveness: seedling growth and life history strategies of 29 pine (*Pinus*) species. *American Naturalist* **159**:396-419.
- Gurevitch, J., and D. Padilla. 2004. Are invasive species a major cause of extinctions. *Trends in Ecology and Evolution* **19**:470-474.
- Hails, R. S., and K. Morley. 2005. Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends in Ecology and Evolution* **20**:245-252.
- Hänfling, B., and J. Kollmann. 2002. An evolutionary perspective of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:545-546.

- Hangelbroek, H. H., N. J. Ouborg, L. Santamaría, and K. Schwenk. 2002. Clonal diversity and structure within a population of the pondweed *Potamogeton pectinatus* foraged by Bewick's swans. *Molecular Ecology* **11**:2137-2150.
- Hansen, K. T., R. Elven, and C. Brochmann. 2000. Molecules and morphology in concert: tests of some hypotheses in arctic *Potentilla* (Rosaceae). *American Journal of Botany* **87**:1466-1479.
- Hanski, I., and M. Gilpin. 1991. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society* **42**:3-16.
- Haraldson, K. 1978. Anatomy and taxonomy in Polygonaceae subfam. Polygonoideae Meisn. emend. Jaretzky. *Symbolae Botanicae Upsalienses* **XXII**:98 pp.
- Harlan, J. R., and J. M. J. deWet. 1975. On ö winge and a prayer: the origins of polyploidy. *The Botanical Review* **41**:361-390.
- Hathaway, S. 2000. Surveys on the spread of Japanese knotweed *Fallopia japonica* in Swansea and strategies for its control. *Aspects of Applied Biology* **28**:55-62.
- Hegarty, M. J., and S. J. Hiscock. 2005. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New phytologist* **165**:411-423.
- Hobbs, R. J., and S. E. Humphries. 1995. An integrated approach to the ecology and management of plant invasions. *Conservation Biology* **9**:761-770.
- Holbrook, S. J., and R. J. Schmitt. 1988. The combined effects of predation risk and food reward on patch selection. *Ecology* **69**:125-134.
- Hollingsworth, M. L., and J. P. Bailey. 2000a. Evidence for massive clonal growth in the invasive weed *Fallopia japonica* (Japanese knotweed). *Botanical Journal of the Linnean Society* **133**:463-472.
- Hollingsworth, M. L., and J. P. Bailey. 2000b. Hybridisation and clonal diversity in some introduced *Fallopia* species (Polygonaceae). *Watsonia* **23**:111-121.
- Hollingsworth, M. L., J. P. Bailey, P. M. Hollingsworth, and C. Ferris. 1999. Chloroplast DNA variation and hybridization between invasive populations of Japanese knotweed and giant knotweed (*Fallopia*, Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **129**:139-154.
- Hollingsworth, M. L., P. M. Hollingsworth, G. I. Jenkins, J. P. Bailey, and C. Ferris. 1998. The use of molecular markers to study patterns of genotypic diversity in some invasive alien *Fallopia* spp. (Polygonaceae). *Molecular Ecology* **7**:1681-1691.
- Holub, J. 1970. *Fallopia* Adans. 1763 instead of *bilderdykia* Dum. *Folia Geobotanica and Phytotaxonomica* **6**:171-177.
- Huang, H., and L. Zhang. 2007. A study of the population dynamics of *Spartina alterniflora* at Jiuduansha shoals, Shanghai, China. *Ecological Engineering* **29**:164-172.
- Hussey, B. M. J., D. Anderson, and S. Loney. 1992. A checklist of plants found growing in a native or naturalized state on Culeenup Australia. *West Australian Naturalist* **19**:35-43.
- Ingram, R., and H. J. Noltie. 1995. *Senecio cambrensis* Rosser, Biological Flora of the British Isles. *Journal of Ecology* **83**:537-546.
- IUCN. 2000. IUCN guidelines for the prevention of biodiversity loss caused by alien invasive species. IUCN, Gland **24**.
- Jacquemart, A. L., and J. D. Thompson. 1996. Floral and pollination biology of three sympatric *Vaccinium* (Ericaceae) species in the Upper Ardennes, Belgium. *Canadian Journal of Botany* **74**:210-221.
- Jager, C. 1994. Repartition, écologie et possibilités de contrôle de l'expansion de la renouée du Japon en Lorraine. Mémoire de Maîtrise. Université de Metz, Metz.
- Jalas, J., and J. Suominen. 1979. Atlas florae europaeae. 4. Polygonaceae. Societas Vanamo, Helsinki, Finland.

- Kamler, J. F., and P. S. Gipson. 2000. Space and habitat use by resident and transient coyotes. *Canadian Journal of Zoology* **78**:2106-2111.
- Keane, R. M., and M. J. Crawley. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:164-170.
- Kearns, C. A., and D. W. Inouye. 1993. Techniques for pollination biologists. The University Press of Colorado, Colorado.
- Kim, J. Y., and C.-W. Park. 2000. Morphological and chromosomal variation in *Fallopia* section *Reynoutria* (Polygonaceae) in Korea. *Brittonia* **52**:34-48.
- Kolar, C. S., and D. M. Lodge. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology and Evolution* **16**:199-204.
- Lambinon, J., L. Delvosalle, and J. Duvigneaud. 2004. Nouvelle flore de la Belgique, du grand-duché de Luxembourg, du nord de la France et des régions voisines (Ptéridophytes et Spermaphytes). Jardin Botanique National de Belgique, Meise, Belgique.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* **241**:1455-1460.
- Lee, C. E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:386-391.
- Leger, E. A., and K. J. Rice. 2003. Invasive California poppies (*Eschscholzia californica* Cham.) grow larger than native individuals under reduced competition. *Ecology Letters* **6**:257-264.
- Levin, D. A. 1975. Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon* **24**:35-43.
- Levin, D. A. 2000. The origin, expansion and Demise of plant species. Oxford University Press, Oxford.
- Lexer, C., Z. Lai, and L. H. Rieseberg. 2004. Candidate gene polymorphisms associated with salt tolerance in wild sunflower hybrids: implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *New phytologist* **161**:225-233.
- Liu, B., and J. F. Wendel. 2003. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**:365-379.
- Lonsdale, W. M. 1999. Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility. *Ecology* **80**:1522-1536.
- Lopez, M. G., A. F. Wulff, L. Poggio, and C. C. Xifreda. 2005. Chromosome numbers and meiotic studies in the species of *Senecio* (Asteraceae) from Argentina. *Botanical Journal of the Linnean Society* **148**:465-474.
- Lowe, A. J., and R. J. Abbott. 2004. Reproductive isolation of a new hybrid species, *Senecio eboracensis* Abbott & Lowe (Asteraceae). *Heredity* **92**:386-395.
- Lui, K., F. L. Thompson, and C. G. Eckert. 2005. Causes and consequences of extreme variation in reproductive strategy and vegetative growth among invasive populations of a clonal aquatic plant, *Butomus umbellatus* L. (Butomaceae). *Biological Invasions* **7**:427-444.
- Mack, R. N., D. Simberloff, W. M. Lonsdale, H. Evans, M. Clout, and F. A. Bazzaz. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Issues in Ecology* **5**:1-20.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* **20**:229-237.
- Mandak, B., P. Pysek, and K. Bimova. 2004. History of the invasion and distribution of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic : a hybrid spreadind faster than its parents. *Preslia, Praha* **76**:15-64.

- Mandák, B. B. C., K. B. E. Bímová, P. Pyšek, J. Štěpánek, and I. Placková. 2005. Isoenzyme diversity in *Reynoutria* (Polygonaceae) taxa: escape from sterility by hybridization. *Plant Systematics and Evolution* **253**:219-230.
- Mandák, B. B. C., P. Pyšek, and K. B. E. Bímová. 2004. History of the invasion and distribution of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic: a hybrid spreading faster than its parents. *Preslia, Praha* **76**:15-64.
- Mandák, B. B. C., P. Pyšek, M. Lysak, J. Suda, A. Krahulcova, and K. B. E. Bímová. 2003. Variation in DNA-ploidy levels of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic. *Annals of Botany* **92**:265-272.
- Manly, B. F. J., L. L. McDonald, and D. L. Thomas. 1993. Resource selection by animals: statistical design and analysis for field studies. Chapman and Hall, London.
- Maron, J. L., and M. Vilà. 2001. When do herbivores affect plant invasions? Evidence for the natural enemies and biotic resistance hypotheses. *Oikos* **95**:361-373.
- Maron, J. L., M. Vilà, R. Bommarco, S. Elmendorf, and P. Beardsley. 2004. Rapid evolution of an invasive plant. *Ecological Monographs* **74**:261-280.
- Maruta, E. 1976. Seedling establishment of *Polygonum cuspidatum* on Mount Fuji, Japan. *Journal of Ecology* **26**:101-105.
- Marvier, M., P. Kareiva, and M. G. Neubert. 2004. Habitat destruction, fragmentation, and disturbance promote invasion by habitat generalists in a multispecies metapopulation. *Risk Analysis* **24**:869-878.
- Meerts, P., and M.-S. Tiébré. In press. *Fallopia × bohemica* est beaucoup plus répandu que *F. sachalinensis* dans la région de Bruxelles. *Dumotiera*.
- Meyer, J. Y., and J. Florence. 1996. Tahiti's native flora endangered by the invasion of *Miconia calvescens* DC. (Melastomaceae). *Journal of Biogeography* **23**:775-781.
- Mooney, H. A., and E. E. Cleland. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings National Academy of Sciences* **98**:5446-5451.
- Mooney, H. A., and R. J. Hobbs. 2000. Invasive species in a changing world. Island Press, Washington, USA.
- Muller, S. 2000. Les espèces végétales invasives en France: bilan des connaissances et proposition d'action. *Revue Ecologie (Terre Vie) Supplément* **7**.
- Müller-Schärer, H., U. Schaffner, and T. Steinger. 2004. Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trends in Ecology and Evolution* **19**:417-422.
- Newsome, A. E., and I. R. Noble. 1986. Ecological and physiological characters of invading species. Pages 1-20 in R. H. Groves and J. J. Burdon, editors. *Ecology of biological invasions*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Noble, I. R. 1989. Attributes of invaders and the invading process: terrestrial and vascular plants. Pages 301-313 in J. A. Drake, H. A. Mooney, F. di Castri, R. H. Groves, F. K. Kruger, M. Rejmánek, and M. Williamson, editors. *Biological invasions: a global perspective*. John Wiley and Son, Chichester.
- O'Hanlon, P. C., R. Peakall, and D. T. Briese. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals introgression in weedy *Onopordum* thistles: hybridization and invasion. *Molecular Ecology* **8**:1239-1246.
- Ozkan, H., A. Avraham, and M. Feldman. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) Group. *The Plant Cell* **13**:1735-1747.
- Panetta, F. D., and A. J. Hopkins. 1991. Weeds in corridors: invasion and management. Pages 341-351 in D. A. Saunders and R. J. Hobbs, editors. *Nature conservation 2: The role of corridors*. Surrey Beatty and Sons, London.
- Parendes, L. A., and J. A. Jones. 2000. Role of light availability and dispersal in exotic plant invasion along roads and streams in the H. J. Andrews experimental forest, Oregon. *Conservation Biology* **14**:64-75.

- Pashley, C. H., J. P. Bailey, and C. Ferris. 2003. Further evidence of the role of Dolgellau, Wales, in the production and dispersal of Japanese knotweed *s. l.* Pages 197-211 in L. Child, J. H. Brock, G. Brundu, K. Prach, P. Pyšek, M. P. Wade, and M. Williamson, editors. Plant invasions: ecological threats and management solutions. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Pashley, C. H., J. P. Bailey, and C. Ferris. 2007. Clonal diversity in British populations of the alien invasive giant knotweed, *Fallopia sachalinensis* (F. Schmidt) Ronse Decraene, in the context of European and Japanese plants. *Watsonia* **26**:359-371.
- Pashley, C. H., J. P. Bailey, and C. Ferris. In press. Clonal diversity in British populations of the alien invasive giant knotweed, *Fallopia sachalinensis* (F. Schmidt) Ronse Decraene, in the context of European and Japanese plants. *Watsonia*.
- Pauchard, A., and P. B. Alaback. 2004. Influence of elevation, Land use, and landscape context on patterns of alien plant invasions along roadsides in protected areas of South-Central Chile. *Conservation Biology* **18**:238-248.
- Paun, O., T. F. Stuessy, and E. Hörandl. 2006. The role of hybridization, polyploidization and glaciation in the origin and evolution of the apomictic *Ranunculus cassubicus* complex. *New phytologist* **171**:223-236.
- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**:288-295.
- Perrins, J., A. Fitter, and M. Williamson. 1993. Population biology and rates of invasion of three introduced *Impatiens* species in the British Isles. *Journal of Biogeography* **20**:33-44.
- Persson, H. A., and B. A. Gustavsson. 2001. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. *Molecular Ecology* **10**:1385-1397.
- Petit, R. J. 2004. Biological invasions at the gene level. *Diversity and Distributions* **10**:159-165.
- Petit, R. J., C. Bodénès, A. Ducouso, G. Roussel, and A. Kremer. 2004. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New phytologist* **161**:151-164.
- Pfennig, K. S. 2003. A test of alternative hypotheses for the evolution of reproductive isolation between spadefoot toads: support for the reinforcement hypothesis. *Evolution* **54**:2174-2175.
- Pieret, N., N. Perlot, and G. Mahy. 2005. Recensement des populations d'espèces invasives cibles le long du réseau routier Namurois. Pages 20-27 in H. Raeymaekers, editor. Cahiers d'écologie urbaine: URBS Namurcensis. Comité Scientifique de la Conservation de la Nature et de la Protection des Eaux, ASBL, Namur, Belgium.
- Pimentel, D., L. Lach, R. Zuniga, and D. Morrison. 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *Bioscience* **50**:53-65.
- Poulin, J., S. G. Weller, and A. K. Sakai. 2005. Genetic diversity does not affect the invasiveness of fountain grass (*Pennisetum setaceum*) in Arizonia, California and Hawaii. *Diversity & Distributions* **11**:241-247.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-959.
- Pyšek, P. 1997. Clonality and plant invasions: can a trait make a difference? Pages 405-427 in H. de Kroon and v. G. J., editors. The ecology and evolution of clonal plants. Backhuys Publishers, Leiden.
- Pyšek, P., B. Mandák, T. Francirkova, and K. Prach. 2001. Persistence of stout clonal herbs as invaders in the landscape: a field test of historical records. Pages 235-244 in G. Brundu, J. Brock, I. Camarda, L. Child, and M. Wade, editors. Plant invasions: species ecology and ecosystem management. Backhuys, Leiden, Netherlands.

- Pyšek, P., J. H. Brock, K. Bímová, B. Mandák, V. Jarosík, I. Koukolíková, J. Pergl, and J. Stepánek. 2003. Vegetative regeneration in invasive *Reynoutria* (Polygonaceae) taxa: the determinant of invasibility at the genotype level. *American Journal of Botany* **90**:1487-1495.
- Pyšek, P., and K. Prach. 1993. Plant invasions and the role of riparian habitats: a comparison of four species alien to central Europe. *Journal of Biogeography* **20**:413-420.
- Pyšek, P., K. Prach, and P. Smilauer. 1995. Relating invasion success to plant traits: an analysis of the Czech alien flora. *in* P. Pyšek, K. Prach, M. Rejmánek, and M. Wade, editors. *Plant invasions-general aspects and special problems*. SPB Academic, Amsterdam, The Netherlands.
- Pyšek, P., and D. M. Richardson. 2006. The biogeography of naturalization in alien plants. *Journal of Biogeography* **33**:2040-2050.
- Ramsey, J., and D. W. Schemske. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual review of ecology and systematics* **29**:467-501.
- Rejmánek, M. 1995. What makes a species invasive? Pages 3-13 *in* P. Pyšek, K. Prach, and M. Wade, editors. *Plant invasions: general aspects and special problems*. SPB Academic Publishing, Amsterdam.
- Rejmánek, M., and D. M. Richardson. 1996. What attributes make some plant species more invasive? *Ecology* **77**:1655-1661.
- Richards, C., O. Bossdorf, N. Muth, J. Gurevitch, and M. Pigliucci. 2006. Jack of all trades, master of some? on the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters* **9**:981-993.
- Richardson, D. M., P. M. Holmes, K. J. Esler, S. M. Galatowitsch, J. C. Stromberg, S. P. Kirkman, P. Pyšek, and R. J. Hobbs. 2007. Riparian vegetation: degradation, alien plant invasions, and restoration prospects. *Diversity and Distributions* **13**:126-139.
- Richardson, D. M., P. Pyšek, M. Rejmánek, M. G. Barbour, F. D. Panetta, and C. J. West. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity & Distributions* **6**:93-107.
- Rieseberg, L. H., and J. F. Wendel. 2004. Plant speciation - rise of the poor cousins. *New Phytologist* **161**:3-8.
- Roblin, E. 1988. Chemical control of Japanese knotweed (*Reynoutria japonica*) on river banks in South Wales. *Aspects of Applied Biology* **16**:201-207.
- Rout, G. R., D. Bhattacharya, R. M. Nanda, S. Nayak, and P. Das. 2003. Evaluation of genetic relationships in *Dalbergia* species using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation* **12**:197-206.
- Saillard, J. 2002. Lutte expérimentale contre la renouée du Japon sur l'Allier. *in* Journées techniques nationales "renouées". Association Echel, Besançon, France.
- Saintenoy-Simon, J. 2003. Les plantes exotiques naturalisées et les espèces invasives de Wallonie. *Parcs et Réserves* **58**:23-39.
- Saintenoy-Simon, J. 2006. Plantes exotiques invasives. Ministère de la Région Wallonne, D.G.R.N.E., Jambes-Belgique.
- Saintenoy-Simon, J. 2007. Editorial et appel aux membres de l'A.E.F. *Adoxa* **54**.
- Sakai, A. K., F. W. Allendorf, J. S. Holt, D. M. Lodge, J. Molofsky, K. A. With, S. Baughman, R. J. Cabin, J. E. Cohen, N. C. Ellstrand, D. E. McCauley, P. O'Neil, I. M. Parker, J. N. Thompson, and S. G. Weller. 2001. The population biology of invasive species. *Annual review of ecology and systematics* **32**:305-332.
- Salmon, A., M. L. Ainouche, and J. F. Wendel. 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* **14**:1163-1175.

- Sauer, J. D. 1988. Plant migration: the dynamics of geographic patterning in seed plant species. University of California Press, Berkeley, California, USA.
- Schamp, E., and J. P. Hannequart. 1999. Atlas de la flore de la Région de Bruxelles-Capitale. Rapport technique IBGE. IBGE-BIM, Bruxelles.
- Schnitzler, A. 2002. Les renouées géantes en Europe. *in* Echel, editor. Actes des journées techniques nationales "Renouées". Direction régionale de l'environnement Franche-Comté, Besançon - France.
- Schnitzler, A., and S. Muller. 1998. Ecologie et biogéographie de plantes hautement invasives en Europe: les renouées géantes du Japon (*Fallopia japonica* et *F. sachalinensis*). *Revue Ecologie (Terre Vie)* **53**:3-38.
- Shaffer, M. 1987. Minimum viable populations: coping with uncertainty. Pages 69-86 *in* M. Soulé, editor. *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Silander, J. A. 1985. Microevolution in clonal plants. Pages 107–152 *in* J. B. C. Jackson, L. W. Buss, and R. E. Cook, editors. *Population biology and evolution of clonal organisms*. Yale University Press, New Haven, Connecticut.
- Silvertown, J., and D. Charlesworth. 2001. *Plant population biology*, fourth edition. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Simberloff, D. 2003. How much information on population biology is needed to manage introduced species? *Conservation Biology* **17**:83-92.
- Simons, A. M. 2003. Invasive aliens and sampling bias. *Ecology Letters* **6**:278-280.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis, J. C. Pires, A. Kovarik, J. A. Tate, and E. Mavrodiev. 2004. Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**:485-501.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis, and J. A. Tate. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New phytologist* **161**:173-191.
- Soltis, P. S., G. M. Plunkett, S. J. Novak, and D. E. Soltis. 1995. Genetic variation in *Tragopogon* species: additional origins of the allotetraploids *T. mirus* and *T. miscellus* (Compositae). *American Journal of Botany* **82**:1329-1341.
- Soltis, P. S., and D. E. Soltis. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings National Academy Sciences of the United States of America* **97**:7051-7057.
- Song, I. J., S. K. Hong, H. O. Kim, B. Byun, and Y. Gin. 2005. The pattern of landscape patches and invasion of naturalized plants in developed areas of urban Seoul. *Landscape and Urban Planning* **70**:205-219.
- Song, K., P. Lu, K. Tang, and T. C. Osborn. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proceedings National Academy of Sciences* **92**:7719-7723.
- Starfinger, U., I. Kovarik, M. Rode, and H. Schepker. 2003. From desirable ornamental plant to pest to accepted addition to the flora? - the perception on an alien tree species through the centuries. *Biological invasions* **5**:323-335.
- Tanaka, H. 1966. The insect visitors of *Polygonum cuspidatum* Sieb. and Zucc. *Collecting and Breeding* **28**:141-143.
- Thébaud, C., and D. Simberloff. 2001. Are plants really larger in their introduced ranges? *American Naturalist* **157**:231-236.
- Thompson, K., J. Bakker, and R. Bekker. 1997. *The soil seed banks of North West Europe: methodology, density and longevity*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tiébré, M.-S., J.-P. Bizoux, O. J. Hardy, J. P. Bailey, and G. Mahy. In press. Hybridization and morphogenetic variation in the invasive alien *Fallopia* (Polygonaceae) complex in Belgium (Western Europe). *American Journal of Botany*.

- Tiébré, M.-S., S. Vanderhoeven, L. Saad, and G. Mahy. 2007. Hybridization and sexual reproduction in the invasive alien *Fallopia* (Polygonaceae) complex in Belgium. *Annals of Botany* **99**:193-203.
- Torimaru, T., N. Tomaru, N. Nishimura, and S. Yamamoto. 2003. Clonal diversity and genetic differentiation in *Ilex leucoclada* M. patches in an old-growth beech forest. *Molecular Ecology* **12**:809-818.
- Van Landuyt, W., I. Hoste, L. Vanhecke, P. Van den Bremt, W. Vercruyse, and D. De Beer. 2006. Atlas van de Flora van Vlaanderen en het Brussels Gewest. Instituut voor Natuur-en Bosonderzoek, Nationale Plantentuin van België, Brussels, Belgium.
- Van Rompaey, E., and L. Delvosalle. 1979. Atlas de la flore belge et luxembourgeoise. Jardin Botanique National, Meise, Belgium.
- Vanden Berghen, C. 1997. La renouée du Japon en Belgique. *Adoxa* **15/16**:35-38.
- Vanderhoeven, S., N. Dassonville, and P. Meerts. 2005. Increased topsoil mineral nutrient concentrations under exotic invasive plants in Belgium. *Plant and Soil* **275**:169-179.
- Vekemans, X., and A. L. Jacquemart. 1997. Use of molecular markers in plant population biology. *Belgian Journal of Botany* **129**:91-100.
- Verloove, F. 2002. Ingeburgerde plantensoorten in Vlaanderen. Brussels. Mededeling van het Instituut voor Natuurbehoud **20**.
- Verloove, F. 2006. Catalogue of neophytes in Belgium. National Botanic Garden, Meise, Belgium.
- Vilà, M., E. Weber, and C. M. D'Antonio. 2000. Conservation implications of invasion by plant hybridization. *Biological Invasions* **2**:207-217.
- Vilà, M., and J. Weiner. 2004. Are invasive plant species better competitors than native plant species? - evidence from pair-wise experiments. *Oikos* **105**:229-238.
- Vitousek, P. M., C. M. D'Antonio, L. L. Loope, M. Rejmanek, and R. Westbrooks. 1997. Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zealand Journal of Ecology* **21**:1-16.
- Voinot, J. B., V. Gaillard, and A. Solviche. 2002. Distribution géographique de la renouée du Japon sur la tête du bassin versant Rhone-Méditerranée-Corse. Elaboration de stratégies de régulation. *in* Journées techniques nationales "renouées". Association Echel, Besançon, France.
- Weber, E. 2003. Invasive plants in the world: a reference guide to environmental weeds. CABI-Publishing, London, UK.
- Wendel, J. F. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* **42**:225-249.
- Widén, B., C. Cronberg, and M. Widén. 1994. Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia Geobotanica and Phytotaxonomica* **7**:245-263.
- Wilcove, D. S. 1998. Quantifying threats to imperiled species in the United States. *Bioscience* **48**:607-615.
- Williamson, M. 1996. Biological invasions. Chapman and Hall, London.
- Williamson, M., and A. Fitter. 1996. The varying success of invaders. *Ecology* **77**:1661-1666.
- Willis, A. J., J. Memmott, and R. I. Forrester. 2000. Is there evidence for the post-invasion evolution of increased size among invasive plant species? *Ecology Letters* **3**:275-283.
- Zika, P. F., and A. L. Jacobson. 2003. An overlooked hybrid Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum* x *sachalinense*; Polygonaceae) in North America. *Rhodora* **105**:143-152.
- Zimmer, M. P., and M. Power. 2006. Brown trout spawning habitat selection preferences and redd characteristics in the Credit River, Ontario. *Journal of Fish Biology* **68**:1333-1346.

