

UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN

Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale

Earth and Life Institute - Agronomy



Interactions plantes-pollinisateurs et reproduction de *Comarum palustre* L. (Rosacées)

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

par **Laurent Somme**

Membres du jury :

Prof. Anne-Laure Jacquemart, Promoteur (Université catholique de Louvain)

Prof. Yvan Larondelle, Président (Université catholique de Louvain)

Prof. Renate Wesselingh, Secrétaire (Université catholique de Louvain)

Prof. Philippe Baret (Université catholique de Louvain)

Dr. Denis Michez (Université de Mons)

Dr. Fabienne Van Rossum (Jardin botanique national de Belgique, Meise)

Dr. Nathalie Escaravage (Université Paul Sabatier, Toulouse, France)

Décembre 2013

Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement de quatre années d'observations, d'analyses, de réflexions et de rédaction. L'année précédant le début de la thèse, dédiée au mémoire qui traitait également de *Comarum palustre*, m'a permis de me familiariser avec le monde de la recherche. Cette thèse n'aurait pu être menée à terme sans l'aide, le soutien et l'inspiration prodigués par de nombreuses personnes rencontrées tout au long de ces quatre années. Qu'elles veuillent bien trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma promotrice Anne-Laure Jacquemart pour son enthousiasme, sa bonne humeur et sa manière inégalable de me remonter le moral lors des différentes embûches rencontrées tout au long de cette thèse. Je la remercie également pour ses judicieux conseils prodigués en abondance, pour sa disponibilité sans faille dans les périodes de rush pour les corrections « minutes » . Merci de m'avoir emmené dans l'aventure du doctorat !

Je tiens également à remercier les Professeurs Philippe Baret et Renate Wesselingh, ainsi que les Docteurs Denis Michez, Nathalie Escaravage et Fabienne Van Rossum pour leurs commentaires éclairés sur la version préliminaire de cette thèse. Leur contribution aura sans nul doute permis d'améliorer ce travail.

Cette recherche n'aurait jamais pu voir le jour sans l'appui financier fourni par le Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA). Je remercie donc l'ensemble de mon comité d'accompagnement, les Docteurs Denis Michez (UMons), Olivier Raspé et Fabienne Van Rossum (Jardin botanique national de Belgique), non seulement pour leurs précieux conseils et leur expérience lors de la rédaction des articles, leur disponibilité tout au long de ces quatre années ; mais surtout pour avoir lancé, en collaboration avec ma promotrice, le projet FRFC dans lequel s'est inscrit cette thèse. J'en profite pour remercier l'équipe du Jardin botanique de Meise et de l'UMons pour leur accueil chaleureux lors de mes passages dans leurs laboratoires, et en particulier Maryse Vanderplanck pour nos longues discussions, son soutien et son enthousiasme lors de la finalisation de cette thèse.

Je remercie Messieurs Serge Rouxhet, Jean-Luc Mairesse et Marc Philippot pour leur aide lors de la recherche des populations de *Comarum palustre* au plateau

des Tailles et en Haute Semois, et des informations concernant les différents sites d'étude.

Bon nombre d'autres personnes m'ont fait cadeau de leur temps et de leurs connaissances. Je tiens à remercier ici le Professeur Xavier Draye pour le temps passé à la programmation du logiciel permettant le classement des graines, Madame Ann Defgnée pour la transmission de son savoir lors de la détermination des grains de pollen, Madame Christel Buyens pour son travail méticuleux, son expérience et nos longs échanges, Messieurs Pierre Van Thorre et Marc Migon pour les soins prodigués aux plants, ainsi que le Docteur Marie-Christine Flamand et Madame Marie-Christine Eloy pour les conseils prodigués lors de l'analyse des données génétiques et le passage des échantillons au séquenceur.

La dernière année de ma thèse, j'ai eu la chance d'encadrer le mémoire d'Isabelle Lombaerde. Je tiens donc à la remercier pour le travail accompli sur le terrain et en laboratoire qui m'a été d'un grand secours. J'espère que cette collaboration lui aura été aussi profitable qu'elle ne le fut pour moi.

Je tiens également à remercier toute l'équipe GENA-POPS pour tous les moments partagés tout au long de ces quatre années. J'ai une pensée toute particulière pour mes collègues passés et actuels, Nathalie Leprince, Carolin Mayer et Muriel Quinet qui, par leur bonne humeur au jour le jour, les longues conversations et tous ces autres petits moments de convivialité, ont fait de cette thèse bien plus qu'un travail. Une dédicace toute particulière à Nath pour tous ces moments de rire et de complicité tant au bureau que sur le terrain, et durant le covoiturage ou les trajets de train, qui ont donné naissance à notre belle amitié.

Je voudrais enfin remercier chaleureusement l'ensemble des membres de ma famille, particulièrement mes parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études et de cette thèse, ainsi que tous mes amis dont les pensées, les ondes positives, les échanges ou la présence m'ont permis d'arriver au bout de cette aventure. Un merci tout particulier à toi, Johan, pour ton indéfectible soutien et ta compréhension durant les éprouvants derniers mois de gestation de cette thèse. Merci également pour ton savoir-faire et ton acharnement en LaTeX qui furent si précieux lors des ultimes efforts de rédaction.

Merci à vous tous qui avez participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse. Par votre soutien, vos connaissances ou votre enthousiasme, vous m'avez permis d'avancer envers et contre tout dans mon projet et d'en ressortir enrichi de rencontres et d'expérience.

Table des matières

1	Introduction générale	1
1.1	Fragmentation des habitats	2
1.1.1	Fragmentation des habitats	2
1.1.2	Dégradation des habitats	5
1.1.3	Conservation et désignation des zones d'action	5
1.1.4	Opérations de gestion	7
1.2	Interactions entre plantes et pollinisateurs	8
1.2.1	Les plantes et le pollen	9
1.2.2	Les insectes et le pollen	13
1.3	Cadre de l'étude	17
1.3.1	Les milieux tourbeux	17
1.3.2	Modèle biologique : <i>Comarum palustre</i> L.	24
1.4	Objectifs de la thèse	34
1.4.1	Les insectes pollinisateurs	34
1.4.2	L'espèce végétale	35
1.5	Plan de thèse	39
I	Caractérisation de la pollinisation entomophile	41
2	Multilevel spatial structure impacts on the pollination services of <i>Comarum palustre</i> (Rosaceae)	43
2.1	Abstract	43
2.2	Introduction	44

TABLE DES MATIÈRES

2.3	Materials and methods	46
2.3.1	Ethics statement	46
2.3.2	Plant species	46
2.3.3	Population spatial characteristics	46
2.3.4	Insect observations	47
2.3.5	Pollen limitation and reproductive success	47
2.3.6	Statistical analyses	48
2.4	Results	52
2.4.1	Insect observations	52
2.4.2	Reproductive success and pollen limitation	53
2.5	Discussion	58
2.5.1	Effect of spatial structure on pollinator abundance and visita- tion rate	58
2.5.2	Reproductive success and pollen limitation	59
2.6	Conclusion	61
2.7	Acknowledgments	61
3	Pollen and nectar quality drive major and minor floral choices of bumble bees	65
3.1	Abstract	65
3.2	Introduction	66
3.3	Methods	67
3.3.1	Bumble bee pollen loads	67
3.3.2	Chemical analyses of pollen loads	68
3.3.3	Nectar sampling and chemical analyses	70
3.3.4	Statistical analyses	70
3.4	Results	71
3.4.1	Bumble bee floral choices and constancy	71
3.4.2	Pollen composition	72
3.4.3	Nectar volume and composition	74
3.5	Discussion	77
3.5.1	Bumble bee floral choices	77

TABLE DES MATIÈRES

3.5.2	Quality of pollen rewards	78
3.5.3	Quality of nectar rewards	79
3.5.4	Effect of reward quality on floral choices	80
3.6	Acknowledgments	81
II	Caractérisation de la structure génétique des populations	83
4	Development and multiplexing of microsatellite markers using pyrosequencing in the clonal plant <i>Comarum palustre</i> (Rosaceae)	85
4.1	Abstract	85
4.2	Introduction	86
4.3	Methods	87
4.4	Results and discussion	92
4.5	Conclusions	94
4.6	Acknowledgments	94
5	Influence of spatial distribution and size of clones on the realized outcrossing rate of the marsh cinquefoil (<i>Comarum palustre</i>)	97
5.1	Abstract	97
5.2	Introduction	98
5.3	Methods	100
5.3.1	Breeding system under controlled conditions	100
5.3.2	Study sites for genetic analyses	101
5.3.3	Sampling for genetic analyses	101
5.3.4	DNA extraction and microsatellite genotyping	103
5.3.5	Genetic diversity and clonal structure	103
5.3.6	Outcrossing rates	104
5.3.7	Paternity analysis	104
5.3.8	Statistical analyses	105
5.4	Results	105
5.4.1	Breeding system	105
5.4.2	Genetic diversity and clonal structure	106

TABLE DES MATIÈRES

5.4.3	Outcrossing rates	110
5.4.4	Paternity analyses and gene flow	110
5.5	Discussion	111
5.5.1	Breeding system	111
5.5.2	Clonal structure	111
5.5.3	Outcrossing rates	112
5.5.4	Pollen dispersal	113
5.6	Implications for conservation	113
5.7	Acknowledgments	114
6	Discussion	116
6.1	La communauté des insectes pollinisateurs	116
6.1.1	Impact de la fragmentation sur la communauté des pollinisateurs	116
6.1.2	Impact des ressources florales sur les pollinisateurs	119
6.1.3	Le cas de la restauration du site de Stockem	121
6.2	Reproduction sexuée et multiplication végétative de <i>Comarum palustre</i>	124
6.2.1	Mode de reproduction	124
6.2.2	Pollinisation entomophile	126
6.2.3	Multiplication végétative et structure clonale	129
6.2.4	Recrutement de plantules	131
6.2.5	Multiplication végétative et reproduction sexuée	132
6.2.6	Zones relais et dispersion du pollen	133
7	Conclusion	135
A	Insect species observed on flowers of <i>Comarum palustre</i>	139
B	Corbicular pollen load content from 58 bumble bee individuals	142
C	List of additional SSRs that could be further developed into markers for <i>Comarum palustre</i>	145

D Productions scientifiques issues de la thèse	146
D.1 Participation à des symposiums et congrès	146
D.1.1 Participation active	146
D.1.2 Participation passive	147
D.2 Travail de fin d'études	147
Bibliographie	148

Chapitre 1

Introduction générale

Depuis la seconde moitié du 20^e siècle, le taux d'extinction des espèces est tel que certains auteurs parlent de la sixième grande crise d'extinction depuis l'apparition de la vie au Cambrien il y a 600 millions d'années (Thomas *et al.* 2004). Quatre grands processus d'origine anthropique sont responsables du déclin actuel (Wilcove *et al.* 1998 ; Frankham *et al.* 2002) :

1. la destruction et la fragmentation des habitats ;
2. l'introduction d'espèces exotiques ;
3. la dégradation de l'environnement (e.g. eutrophisation et salinisation), menant à une diminution de la qualité des habitats ;
4. la surexploitation des espèces et des écosystèmes.

Tous les milieux et toutes les espèces sont touchés. En Europe de l'Ouest, les milieux humides dont font partie les milieux tourbeux ont été particulièrement affectés (Frankard *et al.* 1998 ; Lamers *et al.* 2002). Ces milieux abritent des espèces qui leur sont inféodées et qui sont menacées par la disparition de leur biotope (Kestemont 2010). Parmi les espèces végétales inféodées aux milieux tourbeux, le comaret *Comarum palustre* (Rosacées) est une espèce pionnière rare en Belgique en raison de son caractère acidiphile qui conditionne sa répartition.

Malgré les mesures de restauration et de conservation des habitats prises depuis de nombreuses années, le risque d'extinction d'une espèce inféodée à un biotope reste important au sein de fragments autrefois plus étendus (Bergamini *et al.* 2009). Il est dès lors primordial de connaître l'état de conservation des populations d'espèces animales et végétales dans ces fragments ainsi que de déterminer les facteurs favorables à leur maintien. En effet, elles présentent des réponses contrastées variant selon leurs traits d'histoire de vie. Pour ce faire, il est donc nécessaire d'étudier chaque niveau trophique mais également les interactions existant entre

eux. Alors que les études se sont majoritairement concentrées sur l'étude des populations végétales en milieux tourbeux fragmentés (par exemple, van der Valk & Verhoeven 1988 ; Hooftman & Diemer 2002 ; Middleton *et al.* 2006b), de plus en plus d'études se penchent sur leurs pollinisateurs et les interactions qu'ils entretiennent avec celles-ci (par exemple, Spitzer & Danks 2006 ; Savage *et al.* 2011 ; Mayer *et al.* 2012a ; Mayer *et al.* 2012b).

1.1 Fragmentation des habitats

1.1.1 Fragmentation des habitats

1.1.1.1 Fragmentation et structure spatiale

L'habitat se définit comme l'ensemble des éléments du paysage qui permettent à la population¹ d'une espèce donnée de se développer et de se maintenir. L'ensemble des facteurs abiotiques qui caractérisent l'environnement d'un organisme représente le biotope (Allaby 2010). La fragmentation se définit comme le morcellement d'un habitat ou d'un biotope en de multiples fragments de taille moindre et isolés les uns des autres (Young *et al.* 1996). Deux composantes principales permettent de définir la fragmentation au sens large : d'une part la réduction de la superficie couverte par un type d'habitat ou un biotope dans un paysage (destruction) ; d'autre part le changement de configuration. La destruction des habitats se réfère à des effets radicaux touchant l'ensemble des espèces présentes et ses effets sur l'écosystème sont irréversibles (Brook *et al.* 2003 ; Winfree *et al.* 2009). La destruction des habitats induit un changement dans les populations animales et végétales, les interactions qui existent entre elles et les services écosystémiques qui leur sont liés (Kremen *et al.* 2007 ; Brosi *et al.* 2008). La conversion de l'habitat ou sa perte via son changement d'affectation (e.g. urbanisation, agriculture, sylviculture) résulte des activités humaines. A titre d'exemple, les zones urbanisées en Belgique occupent près de 20% du territoire, soit environ 610 000 ha. En Région wallonne, elles occupent environ 13% du territoire (Brück 2006). La progression de l'urbanisation y a été de l'ordre de 1% au cours de ces 20 dernières années, ce qui correspond à une augmentation de 6 ha/jour (Guillitte 2004).

La fragmentation anthropique induit l'augmentation des différences structurelles entre biotopes, l'augmentation des effets de bordure et l'isolement des biotopes les uns des autres, menaçant la survie des populations qui s'y trouvent (Saunders *et al.* 1991 ; Fahrig 2003 ; Aguilar *et al.* 2006). L'effet de bordure peut être défini comme

1. Population : ensemble d'individus de la même espèce qui peuvent se reproduire entre eux et qui vivent dans un même espace déterminé à un moment donné (Waples & Gaggiotti 2006).

1.1. Fragmentation des habitats

l'ensemble des flux de matière, d'énergie et d'espèces depuis la matrice paysagère² vers le fragment. La proportion de ces flux augmente conjointement avec la fragmentation du paysage (Ryszkowski 1992 dans Honnay *et al.* 2005). En effet, l'augmentation de l'effet de bordure résulte d'une augmentation de la zone de contact, ou lisière, entre les biotopes. L'effet de bordure qui en résulte peut avoir des effets négatifs, positifs ou neutres sur les populations végétales (Honnay *et al.* 2005 ; Burgess *et al.* 2006). En particulier, une étude de Soomers *et al.* (2013) a montré un impact négatif de l'effet de bordure sur l'occurrence de deux espèces végétales typiques des bas-marais alcalins, *Carex lasiocarpa* (Cypéracées) et *Pedicularis palustris* (Orobanchacées). L'isolement se définit quant à lui comme la perturbation de la connectivité entre habitats. La connectivité à proprement parler comporte deux volets : la connectivité structurelle, qui est définie par la configuration spatiale des habitats (topographie, hydrologie, affectation des terres), et la connectivité fonctionnelle, qui est exprimée via le mouvement des individus ou des gènes entre les populations (Kindlmann & Burel 2008 ; Rudnick *et al.* 2012). La fragmentation anthropique crée donc un paysage différent du paysage originel auquel les espèces sont adaptées. Plus la différence entre l'habitat originel et l'habitat issu de la fragmentation est grande, plus importante est la menace pour la survie à long terme des espèces (Doak *et al.* 1992).

Sous nos latitudes, la fragmentation induite par les voies de communication est importante. Par exemple, en Belgique le réseau routier occupe près de 3% du territoire. Avec environ 150 000 *km* de routes, cela représente environ 56,7 *km* de routes pour 1000 *km*² (Dufrêne 2004 ; Brück 2006). La Belgique est également le deuxième pays européen à présenter le réseau de voies ferrées le plus dense avec 116 *km* pour 1000 *km*², auquel s'ajoutent 3500 *km* de voies navigables et 300 *km* d'oléoducs (Collectif 2001).

1.1.1.2 Fragmentation et populations végétales

Dans le cas d'organismes non-mobiles tels que les espèces végétales, la fragmentation des habitats peut induire un isolement géographique des fragments de populations via une rupture des flux de gènes, tant par le biais de graines que de pollen (Kwak *et al.* 1998 ; Lienert 2004). L'intensité de cet isolement dépend de la distance entre les populations, de la structure spatiale et de l'intensité des perturbations de la configuration de la matrice paysagère, ainsi que de la capacité de dispersion du pollen et des graines de l'espèce considérée (Kwak *et al.* 1998 ; Piessens *et al.* 2005). De manière générale, plus les populations au sein des fragments sont de taille réduite, c'est-à-dire qu'elles sont composées d'un nombre réduit d'individus,

2. Matrice paysagère : ensemble d'éléments du paysage ne faisant pas partie de l'habitat d'une espèce ou comprenant une partie de l'habitat moins favorable pour une espèce (Swift & Hannon 2010)

plus ces dernières présentent un risque élevé d'appauvrissement de la diversité génétique, tant via une augmentation de la consanguinité entre individus et que via la dérive génétique³ (Young *et al.* 1996 ; Aguilar *et al.* 2008). L'intensité de l'effet de la dérive génétique sur la diversité génétique d'une population est fonction du nombre de générations au cours desquelles la population a été isolée et réduite (Young *et al.* 1996). La diminution de la diversité génétique au sein d'une population peut induire une sensibilité accrue face à la stochasticité environnementale, c'est-à-dire l'ensemble des effets aléatoires des facteurs environnementaux sur les caractéristiques démographiques, et la stochasticité démographique, c'est-à-dire la mortalité et la reproduction aléatoires des individus (Pico & Van Groenendael 2007). A court terme, ces populations peuvent présenter une sensibilité accrue aux maladies et parasites. A plus long terme, cela entraîne une augmentation du risque d'extinction locale de la population (Paul 2003 ; Ashman *et al.* 2004 ; Mhemmed *et al.* 2008) et par conséquent, une perte de diversité génétique et de valeur adaptative de l'espèce à l'échelle de son aire géographique de répartition (Pico & Van Groenendael 2007).

D'autre part, la dépression de consanguinité, définie comme la diminution de la valeur adaptative ou « fitness » d'une population suite à la reproduction entre individus génétiquement apparentés (Charlesworth & Charlesworth 1987), peut accentuer la réduction du nombre d'individus dans les populations fragmentées. La dépression de consanguinité se manifeste le plus souvent par la diminution de la mise à graines suite à l'avortement des graines consanguines. La dépression de consanguinité peut toutefois se manifester aux différents stades de développement des individus, et se traduit notamment par une réduction de la croissance et de la fécondité des individus consanguins ainsi qu'une diminution du taux de recrutement de plantules (Mahy & Jacquemart 1999 ; Wheelwright *et al.* 2006). L'intensité est variable selon le stade et selon l'espèce comme l'ont montré Husband & Schemske 1996 dans une méta-analyse sur 54 espèces végétales.

Diverses études suggèrent un impact négatif de la fragmentation des habitats sur la diversité et la structure génétique des populations végétales (Hooftman *et al.* 2003 ; Galeuchet *et al.* 2005 ; Rossum & Triest 2006 ; Ortego *et al.* 2010). Cependant, il semble que la longévité des individus (annuelle ou pérenne), le mode de reproduction de l'espèce ainsi que sa capacité de dispersion influencent la réponse d'une espèce face aux effets de la fragmentation des habitats sur la génétique des populations (Honnay *et al.* 2006 ; Leimu *et al.* 2006 ; Mhemmed *et al.* 2008 ; Albaldejo *et al.* 2009 ; Ismail *et al.* 2012). Le maintien ou la restauration de la connectivité entre populations permet de contrecarrer les effets négatifs de la fragmentation et de l'isolement qui en découle (Rudnick *et al.* 2012).

3. Dérive génétique : évolution d'une population suite à la modification aléatoire de la fréquence allélique en raison du caractère aléatoire et imprévisible de la transmission des allèles des parents à la descendance (Young *et al.* 1996).

1.1.1.3 Fragmentation et populations animales

Une conséquence inévitable du morcellement de l'habitat et de l'isolement des fragments est la perte d'espèces ou « species relaxation⁴ » (Brooks *et al.* 1999 ; Gonzalez 2000 ; Kelt 2001). L'étendue de la diminution de la diversité spécifique dépendra notamment de la structure et de l'intensité de la perturbation de la configuration de la matrice paysagère, ainsi que des interactions biotiques et abiotiques qui en résulteront (Saunders *et al.* 1991 ; Swift & Hannon 2010). La capacité de dispersion et la démographie des populations animales détermineront les réponses spécifiques individuelles à la fragmentation. Dans le cas d'espèces à faible dispersion ou d'une fragmentation intense, la densité de la population d'une espèce animale peut augmenter dans un premier temps, les sites relictuels servant de zones refuges (Artz & Waddington 2006 ; Brosi *et al.* 2008). Cette augmentation est souvent suivie par l'effondrement de la population en raison de la stochasticité génétique (e.g. dépression de consanguinité ou dérive génétique), démographique (e.g. mortalité et naissances) et/ou environnementale (e.g. ressources insuffisantes pour le maintien de la population) ou une augmentation de la prédation (Bender *et al.* 1998 ; Debinski & Holt 2000 ; Swift & Hannon 2010). Toutefois, les habitats relictuels résultant d'une fragmentation ancienne peuvent présenter une diversité spécifique plus importante que ceux issus d'une fragmentation récente, via le gain d'espèces ayant colonisé ces fragments depuis la matrice paysagère. Ainsi, le nombre d'espèces peut potentiellement augmenter au sein de fragments d'habitats, alors que le nombre d'espèces présentes initialement dans le fragment peut continuer à diminuer (Saunders *et al.* 1991).

1.1.2 Dégradation des habitats

A l'échelle mondiale, environ 60% des écosystèmes de la planète sont considérés comme dégradés ou non durablement utilisés (Joosten & Clarke 2002). La dégradation des écosystèmes, c'est-à-dire la dégradation de l'environnement menant à une diminution de la qualité des habitats, via par exemple l'eutrophisation ou la salinisation, affecte généralement la majorité des espèces qui s'y trouvent ; ses effets peuvent cependant être temporaires (Lamers *et al.* 2002 ; Zerbe *et al.* 2013). Dans les zones humides, elle est majoritairement causée par une pollution atmosphérique ou une charge élevée de particules dans les eaux (dépôts solides et liquides, minéraux ou organiques), entraînant une eutrophisation du milieu (Van Belle *et al.* 2006 ; Craft *et al.* 2007 ; Goldyn 2010). Cette dégradation peut avoir notamment pour effet d'affecter ou d'éliminer les espèces végétales inféodées aux milieux humides oligotrophes, pauvres en éléments nutritifs, ainsi que de favoriser les es-

4. Species relaxation : diminution de la diversité spécifique initialement présente au sein d'un fragment au cours du temps.

pèces sociales compétitives, ce qui entraîne un appauvrissement des communautés végétales (Stehlik & Holderegger 2000 ; Goldyn 2010).

1.1.3 Conservation et désignation des zones d'action

La destruction et la fragmentation des habitats représentent les principales menaces pesant sur la biodiversité à l'échelle mondiale. Afin de préserver ceux encore intacts ou peu dégradés, des zones de protection sont désignées à travers le monde. L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) définit ces zones selon 6 catégories suivant l'intensité de leur protection (de 1 = protection totale, à 6 = gestion des activités humaines dans un objectif de gestion, restauration et protection). En 2007, ces zones protégées représentaient 14% des terres émergées du continent européen, soit quelques 6,5 millions de km^2 . En Belgique, moins de 3% du territoire est sous statut de protection stricte, c'est-à-dire réserves naturelles domaniales, agréées et statuts assimilés (UNEP-WCMC 2008).

Les zones protégées reprennent généralement des biotopes marginaux et rares, le plus souvent oligotrophes, abritant de nombreuses espèces de la Liste Rouge des espèces rares et/ou menacées (Saintenoy-Simon *et al.* 2006). Le but essentiel de cette liste est de rassembler les informations sur les espèces rares et/ou menacées d'extinction, d'évaluer régulièrement l'évolution des risques que courent ces espèces et de procurer des informations permettant de définir les priorités de conservation et d'orienter les mesures de conservation⁵.

En général, les zones de conservation ont été désignées en raison de leur intérêt patrimonial résultant de la rareté des biotopes et des espèces qu'elles abritent. L'intensification des menaces pesant sur ces zones a révélé que leur seule protection n'était pas suffisante pour garantir la conservation à long terme de tous les composants de la biodiversité (e.g. Bergamini *et al.* 2009). Ainsi, s'est développée la notion de restauration écologique visant à augmenter les surfaces des habitats menacés et créer un réseau écologique assurant la connectivité entre fragments (Figure 1.1). Suite à l'émergence de la notion de réseau écologique, l'approche régionale est privilégiée à l'approche locale dans la protection et la conservation des habitats et des espèces (Dufrêne 2004 ; Baguette *et al.* 2013). L'objectif des réseaux écologiques est de répondre à l'isolement des populations et à la fragmentation des paysages. De tels réseaux comprennent des zones noyaux, des corridors et des zones tampons (Figure 1.1). Les zones noyaux reprennent les populations d'espèces et les biotopes à haute valeur patrimoniale et bénéficient d'un statut de protection élevé (Dufrêne 2004). En Belgique, ces zones sont représentées par les Réserves Naturelles Domaniales (RND) et les Réserves Naturelles Agréées (RNA) qui sont les

5. Site web de l'UICN : <http://www.iucn.org/fr/propos/>

1.1. Fragmentation des habitats

statuts de protection les plus stricts puisque toute intervention anthropique y est interdite hormis dans le cadre de leur gestion. Dans ces réserves, les opérations de gestion sont définies selon un plan de gestion⁶ obligatoire. Un plan de gestion est une étude visant la définition des objectifs, des méthodes et des moyens à mettre en oeuvre avant toute mesure de restauration et d'entretien d'une réserve. Son application suit son approbation par l'Exécutif régional wallon. Les corridors représentent les connections entre les noyaux qui peuvent être entourés de zones tampons qui ont pour rôle de diminuer l'impact des activités humaines sur les zones noyaux (Beier & Noss 1998 ; Dufrêne 2004 ; Cristofoli & Mahy 2010). Afin d'obtenir un réseau écologique cohérent, les mesures de restauration et de gestion récentes mises en place en Europe ont pour but de contrer les effets négatifs de la perte et de la fragmentation des habitats et la restauration d'habitats cibles (Cristofoli & Mahy 2010 ; Metsoja *et al.* 2012).

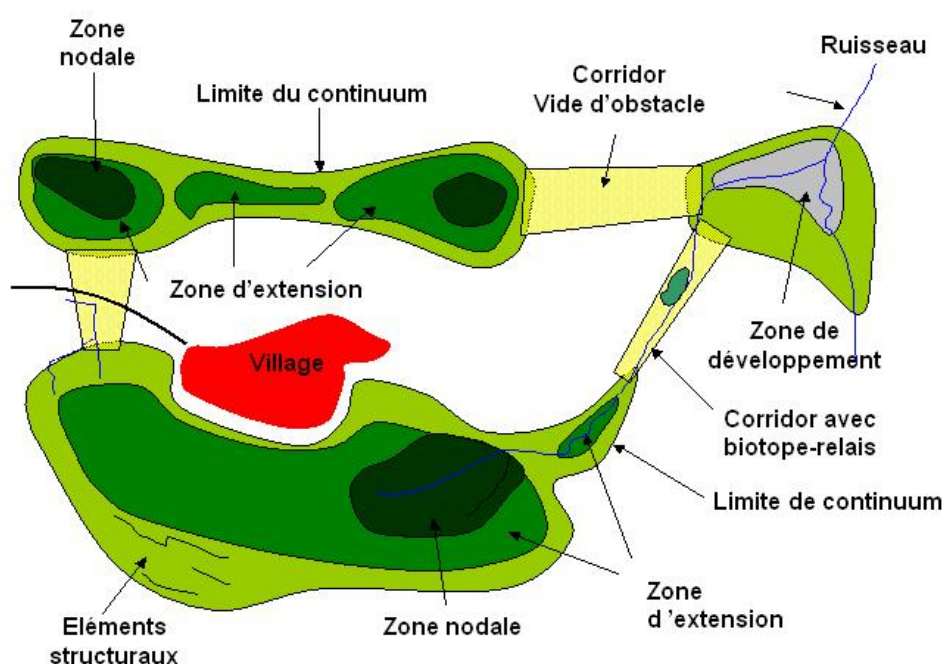


FIGURE 1.1: Représentation schématique des éléments de base d'un réseau écologique au niveau du paysage (source : biodiversite.wallonie.be)

A l'échelle de l'Union Européenne, l'application de la notion de réseau écologique est représentée par le réseau Natura2000. Ce dernier est défini comme un réseau écologique cohérent de zones spéciales de conservation (ZSC) et de zones

6. Décret relatif aux parcs naturels du 16 juillet 1985 (Moniteur Belge M.B. 12.12.1985) ; [http ://environnement.wallonie.be/legis/parcsespacesverts/parc001.htm](http://environnement.wallonie.be/legis/parcsespacesverts/parc001.htm)

de protection spéciale (ZPS) au sein de l'Union Européenne, dont l'objectif est d'assurer la survie à long terme des espèces et des habitats prioritaires ou les plus menacés en Europe selon les directives « Oiseaux » (79/409/CEE) et « Habitats » (92/43/CEE ; Ostermann 1998 ; Alphandéry & Fortier 2001 ; Maiorano *et al.* 2007). Les zones de protection spéciale sont des sites désignés par les Etats membres qui contribuent à la conservation des espèces d'oiseaux repris en annexe I de la directive « Oiseaux » (79/409/CEE). Les zones spéciales de conservation sont des sites d'importance communautaire désignés par les Etats membres où sont appliquées les mesures de conservation nécessaires au maintien ou au rétablissement, dans un état de conservation favorable, des habitats naturels et/ou des populations des espèces pour lesquels les sites sont désignés. Le réseau Natura2000 occupe près de 18% du territoire des Etats membres, soit 145 000 km^2 . Les sites Natura2000 représentent 13% du territoire en Wallonie, soit 220 000 ha (Dufrêne 2004).

1.1.4 Opérations de gestion

1.1.4.1 Restauration

La restauration écologique est définie comme l'ensemble des actions initiant ou accélérant le rétablissement d'un écosystème dégradé, endommagé ou détruit vers un stade choisi (Wheeler 1995 ; Jordan 1997). Cela se traduit par la restauration des conditions physico-chimiques propices aux espèces du biotope ou de l'habitat cible et sous-entend que les communautés d'espèces typiques vont se reconstituer spontanément (Cristofoli & Mahy 2010 ; Menz *et al.* 2011 ; Williams 2011). La restauration peut consister en la réouverture d'un couvert boisé (déboisement ou débroussaillage), l'élimination des horizons organiques superficiels de sol riches en nutriments (étrépage) ou le rétablissement d'un régime hydrique favorable (Wheeler 1995 ; Lamers *et al.* 2002 ; Kołos & Banaszuk 2013). Bien que le suivi des mesures de restauration écologique et l'estimation de leur succès mettent souvent l'accent sur les communautés végétales (Metsoja *et al.* 2012 ; Hedberg *et al.* 2012), une meilleure compréhension de la réponse des populations animales, et en particulier des pollinisateurs, aux restaurations écologiques est nécessaire (Forup *et al.* 2008 ; Menz *et al.* 2011). Un écosystème est considéré rétabli lorsque sa composition, sa structure et les interactions intrinsèques au biotope sont rétablies (Menz *et al.* 2011 ; Fiedler *et al.* 2012).

1.1.4.2 Entretien

A l'inverse des opérations de restauration écologique qui sont considérées comme exceptionnelles, les actions d'entretien sont des opérations régulières (Wheeler 1995). L'entretien des biotopes comprend leur conservation en tant que telle, c'est-à-dire la

1.2. Interactions entre plantes et pollinisateurs

conservation des conditions biotiques et abiotiques du milieu, ainsi que l'amélioration de ces conditions mais également les interactions existant entre plantes et animaux (Forup *et al.* 2008 ; Cristofoli & Mahy 2010). Il est nécessaire de prendre en compte la notion de temporalité. En effet, bon nombre d'espèces n'occupent que des biotopes ou une succession de biotopes bien spécifiques. Dès lors quand un site est converti en zone protégée, l'usage anthropique et les perturbations qu'il entraînait sur le biotope peuvent changer de manière telle, que certaines espèces pionnières précédemment présentes peuvent disparaître. Les perturbations naturelles telles que le pâturage par les herbivores sauvages, les chablis ou les feux sont des éléments nécessaires à la présence de certaines espèces. La gestion d'une zone protégée devrait donc assurer la présence de chaque stade de la succession écologique selon la superficie disponible (Given 1994 ; Reitalu *et al.* 2010).

1.2 Interactions entre plantes et pollinisateurs

Dans le cadre de la protection et de la gestion des biotopes et des espèces végétales qui s'y trouvent, la compréhension de la biologie de la reproduction de ces espèces est nécessaire. En effet, le type de mode de reproduction peut avoir une influence importante sur la démographie et la génétique des populations. Or, pour de très nombreuses espèces, les facteurs-clés de la viabilité des populations restent encore trop peu connus. Les animaux étant les pollinisateurs principaux d'une majorité d'espèces végétales (78% en région tempérée contre 94% en région tropicale ; Ollerton *et al.* 2011), la compréhension des relations existant entre les espèces végétales et leurs pollinisateurs fait partie intégrante de l'étude de la biologie de la reproduction. Compte tenu du caractère parfois généraliste des espèces végétales et de leurs pollinisateurs, la pollinisation peut être considérée au niveau d'un écosystème comme un réseau d'interactions mutualistes ou réseau de pollinisation (Memmott *et al.* 2004 ; Waser & Ollerton 2006). Ainsi, les espèces végétales sont les producteurs de ressources florales que consomment les espèces animales qui les visitent. En contrepartie, ces dernières participent au transfert de pollen entre les fleurs et assurent la pollinisation (Memmott *et al.* 2004).

1.2.1 Les plantes et le pollen

1.2.1.1 Pollinisation et reproduction sexuée

La pollinisation se définit comme le transfert de grains de pollen depuis les anthères et leur dépôt sur les stigmates. La pollinisation est qualifiée d'efficace lorsque les grains de pollen germent une fois déposés sur le stigmate et qu'ils émettent un

tube pollinique menant à la fécondation d'un ovule (-gamie), définie comme la fusion d'un gamète mâle et d'un gamète femelle (Proctor *et al.* 1996). Selon l'origine du pollen, on distingue deux types principaux de pollinisation : l'autopollinisation, pollinisation d'un stigmate par un grain de pollen au sein d'une même fleur, et l'allo-pollinisation, pollinisation d'un stigmate par un grain de pollen issu d'une autre fleur (Proctor *et al.* 1996). Le transfert de pollen entre anthères et stigmates est généralement dépendant d'agents extérieurs comme le vent, l'eau ou les animaux (Ollerton *et al.* 2011).

Lorsque l'autopollinisation induit une fécondation, on parle d'autogamie⁷. Lors d'une autopollinisation spontanée, c'est-à-dire indépendante de tout agent extérieur, menant à une fécondation, on parle de cléistogamie dans le cas de fleurs fermées, et de chasmogamie dans le cas de fleurs ouvertes (Waller 1984). L'allopollinisation, strictement dépendante d'agents extérieurs, comprend la gitono-pollinisation, pollinisation d'un stigmate d'une fleur par un grain de pollen d'une autre fleur appartenant au même individu, menant à la gitonogamie, et l'allopollinisation stricte, menant à l'allogamie⁸. L'allogamie présente l'avantage de maintenir ou d'augmenter la diversité génétique au sein de la population d'une espèce végétale et de diminuer les risques de dépression de consanguinité (Morgan *et al.* 1997 ; Winn *et al.* 2011).

Néanmoins, l'autopollinisation et la gitono-pollinisation n'induisent pas nécessairement l'autogamie. En effet, certaines espèces végétales ont développé différents mécanismes favorisant ou rendant obligatoire l'allogamie. Notamment, l'auto-incompatibilité représente une barrière physiologique à l'autogamie. Les mécanismes d'auto-incompatibilité agissent au niveau de la germination ou du développement du tube pollinique du grain de pollen sur le stigmate via l'intervention de gènes d'auto-incompatibilité, en particulier les S allèles (Barrett 1998). D'autre part, divers mécanismes favorisent ou rendent obligatoire l'allopollinisation. Un premier mécanisme est l'herkogamie, séparation spatiale des organes reproducteurs mâles et femelles au sein d'une même fleur (fleurs hermaphrodites). Un autre mécanisme est la dichogamie, séparation temporelle qui se traduit par l'asynchronisme entre la déhiscence des anthères libérant les grains de pollen et la réceptivité stigmatique (Aizen 2001). Les fleurs dont les anthères sont déhiscentes avant que les stigmates ne soient réceptifs sont appelées protandres, tandis que celles dont les stigmates sont réceptifs avant la déhiscence des anthères sont appelées protogynes (Proctor *et al.* 1996). Toutefois seule la dioécie, séparation spatiale des organes reproducteurs mâles et femelles au sein de fleurs différentes, permet l'allogamie stricte.

7. Autogamie : fusion entre un gamète mâle et un gamète femelle génétiquement identiques.

8. Allogamie : fusion entre un gamète mâle et un gamète femelle génétiquement différents.

1.2.1.2 Limitation de transfert de pollen

La modification des caractéristiques biotiques et/ou abiotiques du milieu peut perturber les interactions existant entre les espèces végétales et leurs pollinisateurs, et plus précisément le succès reproducteur des espèces végétales (Kearns *et al.* 1998 ; Wilcock & Neiland 2002 ; Ashman *et al.* 2004). Dans une méta-analyse regroupant 54 études portant sur 89 espèces végétales, il a été montré que la perturbation du succès reproducteur était due principalement à la limitation du transfert de pollen (Aguilar *et al.* 2006). Cette dernière se produit lorsque la quantité ou la qualité du pollen (i.e. pollen conspécifique, viable, compatible) déposé sur les stigmates est insuffisante pour mener à la fécondation de tous les ovules (Ashman *et al.* 2004 ; Knight *et al.* 2005b).

La limitation du transfert de pollen tire son origine de deux causes principales : le manque de pollinisateurs et/ou le manque de partenaires végétaux impliqués dans la reproduction (Wilcock & Neiland 2002 ; Knight *et al.* 2005b). L'abondance des pollinisateurs est notamment fonction des conditions climatiques, ce qui implique des fluctuations saisonnières voire annuelles. Cependant, ces fluctuations sont accentuées par le déclin généralisé de leurs populations (dont les causes seront abordées par la suite), augmentant les risques de limitation de transfert de pollen pour les espèces végétales (Aizen 2001). La limitation de transfert de pollen peut être importante lorsque le nombre de partenaires végétaux impliqués dans la reproduction est faible. D'une part, les espèces végétales présentes à faible densité dans un biotope risquent d'être moins visitées que d'autres espèces végétales plus abondantes, diminuant leur succès reproducteur (effet de compétition ; Makino *et al.* 2007 ; Elliott & Irwin 2009). Toutefois, il existe des interactions positives entre espèces végétales via le partage des pollinisateurs (effet de facilitation ; Ghazoul 2006). La facilitation surpasse l'effet de compétition lorsque la présence d'une espèce végétale (« magnet species ») permet d'augmenter le succès reproducteur de l'espèce cible par le biais des pollinisateurs (Ghazoul 2006 ; Molina-Montenegro *et al.* 2008). D'autre part, lors de la visite d'un pollinisateur, la probabilité de dépôt de pollen hétérospécifique ou incompatible sur les stigmates est accrue lorsque l'abondance d'une espèce est faible (Kwak & Jennersten 1991 ; Karron *et al.* 2009).

Outre ces deux causes principales, le type de visiteur peut jouer un rôle essentiel dans la limitation du transfert de pollen. Deux types principaux sont décrits par Inouye (1980) : d'une part, les pollinisateurs légitimes qui participent activement au transport de pollen et à la pollinisation, et d'autre part les visiteurs illégitimes qui ne participent pas à la pollinisation. Ces derniers soit consomment du pollen, ce qui a pour effet de diminuer sa disponibilité pour la pollinisation (Hargreaves *et al.* 2009), soit volent le nectar, ce qui a pour effet de diminuer l'attractivité des fleurs. Les conséquences du vol de nectar sur le succès reproducteur et la limitation de transfert de pollen sont quant à elles moins claires et peuvent être négatives, neutres ou

positives (Maloof & Inouye 2000 ; Irwin & Maloof 2002 ; Castro *et al.* 2008).

Les espèces végétales auto-incompatibles et dépendant strictement des insectes pollinisateurs pour leur succès reproducteur sont considérées comme étant les plus vulnérables à la limitation du transfert de pollen (Ashman *et al.* 2004 ; Knight *et al.* 2005b ; Sargent *et al.* 2011). En effet, la limitation du transfert de pollen induit une diminution de la production de graines. Un plus faible nombre de graines produites correspond à une diminution des possibilités de recrutement de nouveaux individus. Lors de perturbations du succès reproducteur, la survie à long terme des populations de ces espèces végétales est menacée. En parallèle, l'abondance des pollinisateurs dépendant des ressources florales de certaines espèces-clés diminue, renforçant le risque de limitation de transfert de pollen. Les pollinisateurs et les espèces végétales entomophiles sont donc intimement liés (Carvell *et al.* 2006a ; Biesmeijer *et al.* 2011 ; Connop *et al.* 2010).

1.2.1.3 Clonalité et multiplication végétative

La clonalité est répandue au sein du règne végétal. En particulier, 80% des Angiospermes des zones tempérées sont capables de propagation clonale (Vallejo-Marín *et al.* 2010). Par exemple, parmi 2760 espèces de plantes vasculaires d'Europe centrale, 67% d'entre elles présentent une propagation clonale (Klimeš *et al.* 1997). La clonalité est fréquente parmi les espèces végétales présentes dans les biotopes présentant des sols pauvres en éléments nutritifs et/ou humides, les plans d'eau ou les biotopes froids des hautes altitudes ou latitudes (Klimeš *et al.* 1997 ; de Witte & Stocklin 2010).

Deux formes de clonalité peuvent être distinguées chez les plantes : l'apomixie et la multiplication végétative. L'apomixie est un processus qui aboutit à la formation de graines dont l'embryon n'est pas issu du développement d'un zygote, dû à l'absence de fécondation (Koltunow *et al.* 1995). Ce processus est cependant assez rare chez les plantes et se rencontre notamment au sein de genres dont les ancêtres réalisent encore la reproduction sexuée (e.g. *Hieracium* sp. ; Tucker & Koltunow 2009).

La multiplication végétative est le processus de croissance d'une plante clonale dans l'espace induisant la formation d'unités génétiquement identiques et potentiellement indépendantes, les ramets (Eriksson 1993 ; Klimeš *et al.* 1997 ; Charpentier 2001). Un genet représente l'individu génétique issu de la germination d'une graine obtenue par reproduction sexuée (Eriksson 1993 ; Klimeš *et al.* 1997).

La croissance dans l'espace par multiplication végétative permet notamment à des espèces pionnières de coloniser un milieu (Klimeš *et al.* 1997 ; Pan & Price 2001 ; Sammul *et al.* 2004). La multiplication végétative confère à un genet l'avantage de pouvoir exploiter l'hétérogénéité des ressources du sol de façon optimale et

1.2. Interactions entre plantes et pollinisateurs

ainsi assurer sa pérennité, et d'augmenter son pouvoir compétitif en occupant l'espace via l'augmentation de sa taille et de sa densité florale (« flower display » ; Rautiainen *et al.* 2004 ; Louâpre *et al.* 2012). La disposition de ses ramets qui en résulte représente ce qu'on appelle l'architecture clonale du genet (Klimeš *et al.* 1997). Les deux types extrêmes sont le type « phalange » et le type « guerilla », bien que tout un continuum existe. Les plantes caractérisées par une forme de croissance de type « phalange » produisent des connections courtes, ce qui aboutit à une architecture clonale où les ramets forment un front de progression compact. Les plantes caractérisées par une forme de croissance de type « guerilla » produisent des connections plus longues induisant un espacement plus important entre les ramets et permettant un enchevêtrement des clones (Lovett-Doust 1981). Au sein d'une même espèce, la croissance radiale d'un genet peut varier selon l'abondance des ressources disponibles, les conditions (micro-) climatiques et la densité d'autres espèces environnantes (Pan & Price 2001 ; Macek & Lepš 2007 ; Rozema *et al.* 2009).

Des modifications des conditions abiotiques et biotiques peuvent induire la diminution du succès reproducteur d'une espèce et/ou une limitation du recrutement de plantules (Eriksson 1989 ; Honnay & Bossuyt 2005 ; de Witte & Stocklin 2010). Ainsi, le succès reproducteur des espèces végétales sous les climats alpins et arctiques peut être diminué en raison de faibles températures induisant un manque de pollinisateurs ou une inhibition de la germination des graines (de Witte 2011). La clonalité confère l'avantage de maintenir la population végétale et sa pérennité selon la durée de vie des genets (entre 20 et > 2000 ans) par le maintien de la diversité génotypique (Tanner 2001 ; Ehrlén & Lehtilä 2002). Néanmoins, une perte définitive des conditions favorables à la reproduction sexuée ou la germination des graines pourrait entraîner la disparition de la population à long terme suite à la mort successive des individus.

La clonalité intervient également dans le cadre de la reproduction sexuée puisqu'en augmentant la surface occupée par un genet, la multiplication végétative augmente le nombre d'inflorescences et de fleurs de ce genet et son attractivité pour les pollinisateurs. Des études montrent en effet que l'augmentation de la densité florale d'un patch a une influence positive sur son attractivité vis-à-vis des pollinisateurs (Charpentier 2001 ; Grindeland *et al.* 2005). Cependant, le comportement des pollinisateurs à visiter les fleurs en séquence, augmente le taux de gitonopollinisation. Dans le cas d'espèces auto-compatibles, cela mène à une augmentation de la gitonogamie⁹, et à l'obstruction des stigmates (« stigma clogging ») dans le cas d'espèces auto-incompatibles (Wilcock & Neiland 2002 ; Williams 2007 ; Vandepitte *et al.* 2013). Cette obstruction peut induire une limitation de la fécondation des ovules par du pollen compatible, diminuant le succès reproducteur de la fleur et/ou de l'individu (Wilcock & Neiland 2002).

9. Gitonogamie : fécondation résultant de la gitonopollinisation, ce qui revient génétiquement à de l'autogamie.

1.2.2 Les insectes et le pollen

Les Apoïdes représentent un groupe d'insectes pollinisateurs d'une grande importance dans de nombreux écosystèmes. Ils participent à la pollinisation d'une large gamme d'espèces végétales (Petanidou & Ellis 1993). Pour cette raison, la partie introductive relative aux insectes pollinisateurs se focalisera sur ces insectes.

1.2.2.1 Ressources florales : nectar et pollen

Les Apoïdes sont des insectes herbivores qui se nourrissent et qui approvisionnent leurs larves avec deux ressources florales : le nectar et le pollen (Waser *et al.* 1996 ; Kearns *et al.* 1998 ; Michener 2007). Ces espèces d'insectes se distinguent des autres du fait que leurs larves se nourrissent exclusivement des ressources collectées par les adultes (Génissel *et al.* 2002 ; Michener 2007). De par le nombre élevé de fleurs que les adultes visitent pour suppléer aux besoins de leurs larves, les Apoïdes jouent un rôle essentiel dans la pollinisation. Par exemple, une étude de Müller *et al.* (2006) portant sur 41 espèces d'abeilles solitaires a montré que chez 85% d'entre elles l'approvisionnement d'une seule larve nécessitait l'équivalent du contenu pollinique total de plus de 30 fleurs (voire plus de 1000 pour certaines espèces).

1.2.2.1.1 Le nectar

Le nectar présent au niveau des fleurs est produit par les nectaires qui sont des structures sécrétrices différenciées généralement disposées au niveau d'un disque nectarifère (Nicolson *et al.* 2007). Le nectar est composé majoritairement d'une solution de glucides dont les trois principaux sont le glucose, le fructose et le saccharose. Ces derniers sont présents en proportions variables dans le nectar selon l'espèce (Percival 1961), la position de la fleur dans l'inflorescence ou les conditions climatiques (e.g. vent, humidité relative, ensoleillement ; Bertsch 1983 ; Nicolson *et al.* 2007) et sont tous trois facilement digérés par les enzymes sucrases des Apoïdes (Huber & Mathison 1976). Le nectar contient également d'autres éléments mineurs comme des acides aminés, composés les plus abondants après les glucides (Gardener & Gillman 2001), des lipides, divers ions inorganiques et/ou des alcaloïdes (Adler 2000 ; Corbet 2003 ; Gonzalez-Teuber & Heil 2009 ; Nicolson 2011). Ces différents composés ont une influence sur la consommation du nectar par les Apoïdes via des effets sur son appétence ou, au contraire, sa toxicité (Adler 2000 ; Nicolson 2011).

Le nectar représente la principale source d'énergie pour les insectes adultes (Waser & Ollerton 2006). Un nectar dont l'accessibilité est aisée au sein des fleurs

1.2. Interactions entre plantes et pollinisateurs

permettra la visite d'une large gamme d'insectes. Toutefois, l'accessibilité du nectar a une influence directe sur sa concentration. Cette dernière est inférieure dans les fleurs à corolle tubulaire par rapport aux fleurs à corolle courte ou des fleurs ouvertes, à partir desquelles l'eau s'évapore facilement (Harder 1986). Néanmoins, une fleur dont la concentration en sucres du nectar dépasserait 60%, perd de son attractivité vis-à-vis des visiteurs potentiels (Harder 1986).

Certaines espèces d'insectes visiteurs collectent du nectar au niveau des fleurs de certaines espèces végétales sans participer à leur pollinisation, ils sont considérés comme des visiteurs non-légitimes et pratiquent le vol de nectar (Irwin & Maloof 2002 ; Castro *et al.* 2008). Ce dernier représente un coût pour l'individu visité car jusqu'à 37% de la photosynthèse quotidienne sert à la production de nectar (Southwick 1984). En raison de l'énergie exigée pour leur déplacement et la faible production de nectar par une majorité d'espèces végétales entomophiles, les insectes adultes doivent visiter un nombre important de fleurs (Southwick *et al.* 1981 ; Proctor *et al.* 1996). Par exemple, les besoins énergétiques d'un bourdon de 0,5 g pour effectuer un vol d'une heure sont équivalents à l'énergie fournie par la métabolisation de 50 mg de glucides. Près de 1000 fleurs de *Trifolium pratense* seront nécessaires pour assurer de tels besoins énergétiques (Ellington *et al.* 1990). Les individus d'*Apis mellifera* quant à eux visitent près de 8,7 millions de fleurs pour la production de 500 mg de miel pur de *Trifolium repens* (Proctor *et al.* 1996).

1.2.2.1.2 Le pollen

Le pollen est une ressource alimentaire majeure pour les insectes adultes et représente leur principale source de protéines, d'acides aminés et de stérols (Day *et al.* 1990 ; Roulston & Cane 2000 ; Michener 2007). L'accessibilité à ces composés, qui se retrouvent au sein du cytoplasme des grains de pollen, est fonction de la capacité des espèces d'insectes à digérer les couches protectrices externe, l'exine, et interne, l'intine, des grains de pollen. Pour en extraire le contenu nutritif, les abeilles domestiques (et *a fortiori* les espèces d'Apoïdes) ont recours à un choc osmotique qui éclate les grains de pollen lors de leur passage du jabot au ventricule, se trouvant à des pressions osmotiques différentes (Kroon *et al.* 1974).

La qualité nutritive d'un pollen varie considérablement entre les différentes espèces végétales et ce, en terme d'éléments essentiels limitant pour les Apoïdes tels que les protéines, les acides aminés et les stérols (Roulston & Cane 2000 ; Weiner *et al.* 2010). Le taux de protéines dans le pollen varie de 2,5 à 61% et est relativement bien conservé au sein des différentes familles, sauf pour les Fabacées qui présentent une diversité spécifique plus importante (Roulston *et al.* 2000). Les protéines sont nécessaires pour le développement et la croissance des larves, ainsi que pour la survie des ouvrières (Génissel *et al.* 2002 ; Smeets & Duchateau 2003). De

récentes études suggèrent que la composition en acides aminés serait plus à même de déterminer la quantité de pollen nécessaire pour les espèces d'Apoïdes que le contenu protéique (Cook *et al.* 2003 ; Nicolson 2011). Une étude de De Groot (1953) a montré l'existence de dix acides aminés essentiels, c'est-à-dire qui ne peuvent être synthétisés par l'insecte, pour l'abeille domestique *A. mellifera*. La similarité entre ces besoins et ceux d'autres animaux suggère qu'ils pourraient également l'être pour les espèces du genre *Bombus* (Hanley *et al.* 2008). La composition en acides aminés du pollen semble relativement conservée entre les espèces végétales et la plupart contiennent l'intégralité du spectre d'acides aminés essentiels (Roulston & Cane 2000 ; Weiner *et al.* 2010). Enfin, différentes études suggèrent que les stérols présents dans le pollen joueraient un rôle dans l'appétence vis-à-vis des insectes (Svoboda *et al.* 1980 ; Rasmont *et al.* 2005b) puisque, contrairement aux humains, les insectes sont incapables de les synthétiser *de novo* (Behmer & Nes 2003 ; Cohen 2004). Les stérols interviennent notamment en tant que composés membranaires et dans la synthèse des hormones de mue (Behmer & Nes 2003).

Le pollen consommé ou collecté par les insectes ne sera plus mobilisable dans le processus de pollinisation. Cela représente un coût pour la plante puisque le pollen est riche en azote et en phosphore, deux éléments souvent limitant (Proctor *et al.* 1996). Cependant, la quantité de pollen prélevé varie selon l'interaction existant entre l'insecte et la plante. Ainsi, le pollen des orchidées est entièrement dévoué à la pollinisation en raison de la formation des pollinies¹⁰ (Meekers & Honnay 2011). A l'inverse, jusqu'à 95% du pollen produit par une fleur de *Campanula rapunculus* peut être collecté par les abeilles pour leurs besoins propres alors que seuls 5% contribuent à la pollinisation (Schlindwein *et al.* 2005).

1.2.2.2 Réseau alimentaire

Sur base de la définition du réseau alimentaire ou « food web » d'une espèce animale, qui représente l'ensemble des ressources dont elle se nourrit (Dunne *et al.* 2002), l'ensemble des espèces végétales dont les ressources florales (nectar et pollen) sont collectées par les insectes, représente leur réseau alimentaire. Selon la diversité des espèces végétales représentant leurs sources de pollen, les espèces d'Apoïdes sont qualifiées soit de généralistes ou de polylectiques, c'est-à-dire qu'elles visitent plusieurs espèces végétales appartenant à au moins deux familles distinctes ; soit de spécialistes ou d'oligolectiques, c'est-à-dire qu'elles sont spécialisées dans leur choix de pollen et restreignent leurs visites florales à quelques espèces au sein d'une même famille, voire parfois à une seule (espèces monolectiques ; Cartar & Dill 1990 ; Waser & Ollerton 2006 ; Michener 2007). Cependant au

10. Pollinie : structure propre aux Orchidées et aux Asclépiadacées qui correspond à l'agglutination du pollen en une masse collante destinée à être transportée en bloc par le pollinisateur (Meekers & Honnay 2011).

1.2. Interactions entre plantes et pollinisateurs

sein d'une même espèce, chaque individu tend généralement à être constant au cours d'une période de récolte de pollen, c'est-à-dire qu'il ne visite qu'une ou deux espèces végétales (Waser 1986 ; Gruter & Ratnieks 2011). *A contrario*, les individus collectent généralement le nectar de plusieurs espèces végétales (Stout & Goulson 2002). Les espèces généralistes (polylectiques) se retrouvent principalement dans les zones climatiques tempérées (Michener 2007) où elles participent à la pollinisation d'une majorité d'espèces végétales (Mommott *et al.* 2004).

Plusieurs facteurs influencent le réseau alimentaire des espèces polylectiques. Il est notamment fonction de la diversité végétale spécifique et de l'abondance de ces espèces végétales autour du site de nidification (Elliott & Irwin 2009 ; Munidasa & Toquenaga 2010 ; Jha & Kremen 2013). L'étude de Munidasa & Toquenaga (2010) montre cependant que, pour une même espèce, une augmentation de la taille de la colonie a une influence positive sur son réseau alimentaire au sein d'un même paysage. La probabilité qu'une espèce végétale fasse partie du réseau alimentaire des espèces polylectiques dépend également de la composition (la qualité) et de l'accessibilité de ses ressources florales. De récentes études montrent, par exemple, que les espèces du genre *Bombus* collectent préférentiellement du pollen riche en protéines (Hanley *et al.* 2008 ; Leonhardt & Blüthgen 2012) ; alors que d'autres études semblent montrer que la composition en acides aminés aurait un effet plus important sur leur comportement de récolte que celui en protéines totales (Cook *et al.* 2003 ; Nicolson 2011). En ce qui concerne le nectar, les espèces du genre *Bombus* dites à courtes langues ne collectent pas le nectar des fleurs tubulaires. Enfin, la qualité des ressources florales dans le milieu naturel ainsi que leur distribution spatiale influencent la croissance des colonies (Goulson *et al.* 2002 ; Westphal *et al.* 2006). Plusieurs études menées sur des élevages de *B. terrestris* en conditions contrôlées ont montré qu'une augmentation de la qualité des ressources mais également de leur diversité avait un impact positif sur le développement des individus et des colonies (Génissel *et al.* 2002 ; Rasmont *et al.* 2005b). Toutefois il existe des différences inter-spécifiques quant à l'utilisation des ressources florales et leur attractivité (Leonhardt & Blüthgen 2012 ; Rollin *et al.* 2013).

1.2.2.3 Déclin des pollinisateurs

Depuis plusieurs décennies, la communauté scientifique fait état d'un déclin généralisé des pollinisateurs (Biesmeijer *et al.* 2006 ; Potts *et al.* 2010). Alors que de récentes études estiment que leur déclin ralentit voire se stabilise depuis les années 1990 (Carvalho *et al.* 2013), certains auteurs s'interrogent sur les espèces réellement affectées (Ghazoul 2005). En effet, de nombreuses études ont mis en lumière des réponses contrastées aux différents facteurs induisant le déclin des pollinisateurs selon l'espèce considérée, la région ou le biotope (Goulson & Darvill 2004 ; Goulson *et al.* 2006 ; Jha & Kremen 2013). De telles constatations ont incité la

communauté scientifique à s'intéresser aux caractéristiques et besoins propres de chaque espèce (Williams *et al.* 2007 ; Goulson *et al.* 2008b ; Connop *et al.* 2010).

Au sein des Apoïdes, outre l'abeille domestique, *Apis mellifera*, le groupe le mieux documenté est celui des bourdons, *Bombus* sp. (Rasmont & Mersch 1988 ; Fitzpatrick *et al.* 2007). Ces derniers montrent des signes de déclin de leur diversité depuis la fin des années 1980, tant en Europe qu'en Amérique du Nord (Biesmeijer *et al.* 2006 ; Potts *et al.* 2010 ; Cameron *et al.* 2011). Selon des études menées en Belgique, 14 des 31 espèces du genre *Bombus* sont en déclin (Rasmont *et al.* 2005a ; Carvalheiro *et al.* 2013). Le déclin des pollinisateurs, et en particulier des Apoïdes, est dû à deux causes majeures que sont la perte des habitats et l'utilisation des insecticides et herbicides (Potts *et al.* 2010 ; Osborne 2012). Les habitats adéquats pour les Apoïdes sont ceux combinant des sites de nidification et de butinage offrant des ressources florales suffisantes pour l'approvisionnement des larves (Westrich 1996 ; Walther-Hellwig & Frankl 2000 ; Winfree 2010). Le changement d'affectation des terres qui est induit, entre autres, par la diminution des cultures fourragères (principalement les Fabacées), l'augmentation de la surface dédiée à l'élevage et à l'agriculture intensifs, et à la sylviculture ainsi que l'urbanisation, provoque la destruction des habitats nécessaires aux Apoïdes (Rasmont *et al.* 2005a ; Potts *et al.* 2010). L'intensification de l'agriculture via la destruction des habitats naturels et semi-naturels a un effet globalement négatif sur les pollinisateurs en diminuant la disponibilité des ressources et des sites de nidification (Kells & Goulson 2003 ; Winfree *et al.* 2009 ; Connop *et al.* 2010). Ainsi, l'intensification de l'agriculture en Grande-Bretagne est à l'origine du déclin de près de 76% des espèces végétales fourragères visitées par les espèces du genre *Bombus* entre 1978 et 1998 (Carvell *et al.* 2006a). De manière générale, les espèces présentant une faible exigence quant à leurs sites de nidification et une diète généraliste sont moins sensibles au changement d'affectation des terres que celles présentant une spécialisation alimentaire, due notamment à un cycle court des colonies et une exigence élevée vis-à-vis de ressources florales de qualité (Goulson & Darvill 2004 ; Goulson *et al.* 2008b).

La problématique de l'impact des insecticides et des herbicides sur les pollinisateurs suscite un intérêt croissant puisque plus de 100 études ont été publiées à ce sujet en 2012 (Osborne 2012). L'usage d'insecticides tels les pyréthroïdes et les nicotinoïdes, induit notamment une mortalité accrue des reines lors de leur émergence ainsi que des ouvrières, une diminution des performances des ouvrières lors de la récolte du pollen et leur désorientation spatiale (Thompson 2001 ; Gill *et al.* 2012 ; Osborne 2012). Les composés des pesticides agissant de façon concomitante, leurs effets combinés entraînent l'effondrement de la colonie (Krupke *et al.* 2012). Les herbicides diminuent l'abondance et la diversité des espèces végétales au sein des biotopes et donc des ressources alimentaires disponibles pour les insectes pollinisateurs (Biesmeijer *et al.* 2006). En outre, les herbicides peuvent directement affecter les pollinisateurs via l'accumulation des composés toxiques dans le

pollen et le nectar qu'ils consomment (Kubik *et al.* 1999 ; Mullin *et al.* 2010).

A l'échelle mondiale, d'autres menaces existent pour les insectes pollinisateurs telles l'importation de pollinisateurs exotiques pouvant concurrencer les pollinisateurs indigènes (Nagamitsu *et al.* 2007) et parfois porteurs de pathogènes (Potts *et al.* 2010 ; Meeus *et al.* 2011), et les changements climatiques globaux (Hegland *et al.* 2009 ; Bartomeus *et al.* 2011).

1.3 Cadre de l'étude

1.3.1 Les milieux tourbeux

1.3.1.1 Description générale

Les tourbières constituent des milieux humides particuliers où se forme et s'accumule de la tourbe. La tourbe est un sol organique fossile composé d'environ 40% de carbone, constituée au minimum de 20 à 30% de matière organique. Cette dernière est issue de débris végétaux non décomposés du fait de l'anoxie (Payette & Rochefort 2001 ; Jacquemart & Angenot 2004). Les tourbières sont des écosystèmes saturés en eau et généralement oligotrophes, dont l'épaisseur de tourbe atteint plus de 40 *cm* (Wheeler & Proctor 2000 ; Payette & Rochefort 2001). Ces milieux tourbeux proprement dits se distinguent des milieux semi-tourbeux dans lesquels l'épaisseur de la couche de tourbe est inférieure à 40 *cm*, et des milieux para-tourbeux dont la teneur en carbone de la tourbe est inférieure à 20% (Joosten & Clarke 2002 ; Mathieu & Lozet 2011).

La tourbe ne pouvant se former que dans des milieux constamment gorgés d'eau, la condition indispensable à la formation et au développement des tourbières est l'existence d'un bilan hydrique positif. L'apport en eau (e.g. précipitations, ruissellement, nappe phréatique) doit être égal ou supérieur aux pertes (e.g. évapotranspiration, écoulements latéraux ou verticaux ; Frankard *et al.* 1998 ; Joosten & Clarke 2002 ; Jacquemart & Angenot 2004). Différents facteurs interviennent dans l'établissement d'un tel bilan. D'un point de vue climatique, les précipitations tant sous forme de pluie, de neige que de brouillard, doivent être suffisamment importantes et régulières tout au long de l'année. Sous nos latitudes, les précipitations annuelles de l'ordre de 1000 *mm* permettent la formation des tourbières. Des températures basses même en été (entre 2 et 7°C) diminuent l'évapotranspiration et les phénomènes de minéralisation de la tourbe (Jacquemart & Angenot 2004 ; Montanarella *et al.* 2006). Cependant, des tourbières peuvent se développer sous des climats tropicaux humides et équatoriaux grâce au bilan hydrique positif de ces régions (Joosten & Clarke 2002). Certaines conditions locales favorisent également la formation de tourbières. Ainsi, la topographie joue un rôle important notamment via

l'accumulation d'eau dans des dépressions du sol ou son écoulement lent le long de faibles pentes, créant ainsi des conditions favorables (Payette & Rochefort 2001 ; Jacquemart & Angenot 2004 ; Montanarella *et al.* 2006). La perméabilité du substrat géologique, déterminant sa capacité à retenir les eaux, a une influence directe sur le bilan hydrique. D'autre part, ses caractéristiques chimiques (pH et charge ionique) influencent l'accumulation de tourbe, notamment par leurs effets sur l'activité des micro-organismes décomposeurs (Hambuckers *et al.* 1995 ; Aerts *et al.* 1999 ; Payette & Rochefort 2001).

Différents critères permettent la classification des tourbières. D'une part, le pH du milieu permet de préciser le caractère acido-basique des tourbières en trois types : tourbières neutro-alcalines ou carbonatées (pH > 6,5), tourbières mésotrophes ou de transition (pH de 6,5 à 5,5) et tourbières acides ou oligotrophes (pH de 5,5 à 4,0 ; Payette & Rochefort 2001). D'autre part, l'alimentation en eau des tourbières permet de les classer en 5 types principaux (Payette & Rochefort 2001 ; Joosten & Clarke 2002) :

1. tourbière topogène ou tourbière flottante, formée par l'accumulation d'eau dans une dépression topographique, alimentée en eau par la nappe phréatique environnante ;
2. tourbière soligène ou tourbière basse, formée sur une pente douce et alimentée en eau par ruissellement ;
3. tourbière limnogène, formée par l'atterrissement (accumulation de matière organique) d'un plan d'eau ;
4. tourbière telmatogène, formée en contexte alluvial et alimentée par la nappe ;
5. tourbière ombrogène ou tourbière haute, alimentée en eau uniquement par les précipitations.

D'autres types de tourbières existent en régions boréale, tropicale et équatoriale ou en altitude (Hamelin 1957 ; Couillard & Payette 1985 ; Sieffermann 1988), seuls les principaux types de tourbières en Europe de l'Ouest ont été décrits.

De nombreuses tourbières, notamment les tourbières basses, ont été transformées en prairies de fauche suite à leur drainage. Elles n'accumulent dès lors plus de tourbe et sont considérées comme milieux semi-tourbeux (Grootjans *et al.* 1995). Selon l'intensité du drainage et de la modification des conditions édaphiques du milieu, les prairies de fauche sur tourbe peuvent présenter un cortège floristique similaire aux tourbières (Wheeler 1995). De plus, certaines communautés végétales occupent différents types de sol. Ainsi, un type de cariçaie, le *Caricion davallianae* qui comprend de nombreuses espèces typiques des bas-marais alcalins reprises sur la Liste Rouge des Espèces, telles que *Spiranthes spiralis*, *Parnassia palustris* et *Pedicularis palustris* (Kestemont 2010 ; IUCN 2013), se retrouve dans les dépressions dunaires côtières sur sols sableux, dans les vallées des plaines européennes

1.3. Cadre de l'étude

sur sols tourbeux mais aussi dans les tourbières alcalines en Haute Semois et dans les Alpes (Middleton *et al.* 2006a ; Verté 2007).

1.3.1.2 Distribution

Les milieux tourbeux couvrent près de 400 millions d'hectares à travers le monde (Joosten & Clarke 2002). De par les conditions particulières que demande leur formation, les tourbières se retrouvent généralement dans les régions (sub)arctiques et tempérées de l'Hémisphère Nord et à de hautes latitudes ; et en montagne à des altitudes entre 1000 et 1500 *m* à latitude plus basse (Aerts *et al.* 1999 ; Collectif 2002 ; Montanarella *et al.* 2006). A la latitude de la Belgique et de la France, ce sont des milieux relictuels présents essentiellement en altitude. Ils y abritent de nombreuses espèces relictuelles des périodes glaciaires telles que, pour les espèces végétales, *Andromeda polifolia*, le genre *Eriophorum* ou *Vaccinium uliginosum* (Jacquemart & Angenot 2004 ; Frankard 2006).

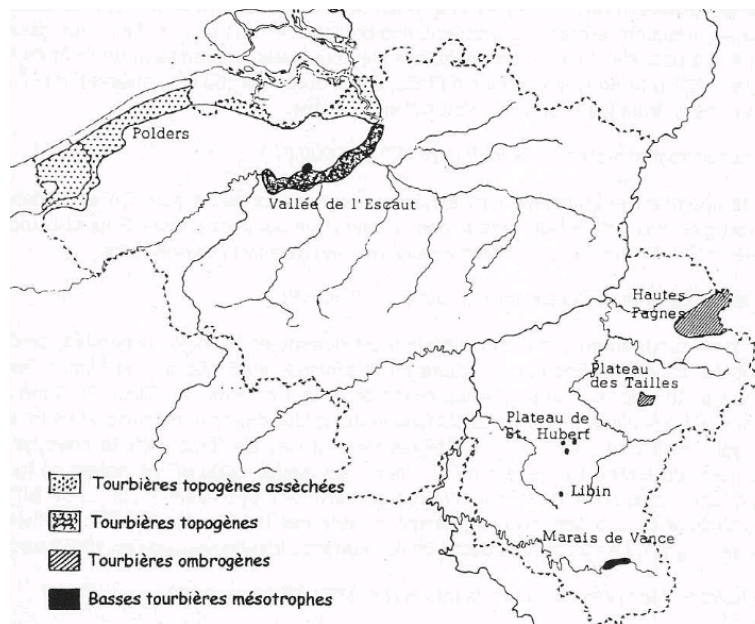


FIGURE 1.2: Répartition des principales tourbières en Belgique en fonction de leur type : tourbières topogènes, tourbières topogènes asséchées, tourbières ombrogènes et basses, et tourbières mésotrophes (Jacquemart & Angenot 2004).

La perte de la surface occupée par les milieux tourbeux au niveau mondial est estimée à environ 16% de sa surface originelle. Des inégalités existent entre continents puisque la surface qu'elles occupaient en Europe et en Afrique a diminué de près de 50% (diminution de 322 000 *km*² et de 5000 *km*², respectivement) alors qu'elle n'est que de 5% en Amérique du Nord (diminution de 65 000 *km*² ; Joosten & Clarke 2002). Au niveau du continent européen, les pays scandinaves (à l'except-

tion de la Finlande), la partie européenne de la Russie et la Roumanie présentent encore plus de 50% de la surface des zones tourbeuses originelles. En Belgique, les milieux tourbeux ont potentiellement couvert près de 15 000 ha par le passé, soit environ 0,8% du territoire (Frankard *et al.* 1998). Alors qu'il n'en subsistait plus qu'un tiers vers 1945, seuls 2000 ha subsistaient en 1997 dont moins de 13% dits intacts (Frankard 2004 ; Manneville *et al.* 2006 ; Figure 1.2). Les zones tourbeuses se trouvent essentiellement en Campine, sur les hauts plateaux ardennais et en Lorraine belge, en particulier en Haute Semois (Frankard *et al.* 1998 ; Jacquemart & Angenot 2004 ; Manneville *et al.* 2006).

1.3.1.3 Causes de la dégradation

Les milieux tourbeux ont fait l'objet d'une exploitation humaine, d'abord modérée puis plus intensive à partir du milieu du 19^e siècle, cette dernière expliquant leur forte régression (Frankard *et al.* 1998 ; Joosten & Clarke 2002).

L'extraction directe de la tourbe comme combustible ou à des fins horticoles diminue de manière irréversible la surface occupée par les milieux tourbeux (Joosten & Clarke 2002 ; Lamers *et al.* 2002). En Belgique, l'exploitation de la tourbe comme combustible jusqu'au milieu du 20^e siècle a contribué à la quasi-totale disparition des tourbières hautes actives sur les hauts plateaux ardennais puisque seuls 200 ha intacts subsistent encore (Frankard 2006 ; Jacquemart *et al.* 2008).

De nombreuses tourbières ont été drainées afin de permettre la plantation d'essences forestières, principalement résineuses. Ces changements d'affectation ont entraîné la disparition ou la dégradation de ces milieux naturels diversifiés (Joosten & Clarke 2002). En particulier, la politique d'enrésinement et de mise en valeur des incultes mise en oeuvre à partir de la deuxième moitié du 19^e siècle en Belgique a entraîné de profonds bouleversements des écosystèmes au sein des milieux tourbeux, d'autant plus que les plantations étaient précédées de travaux de drainage (Frankard 2004). Leur assèchement a entraîné des dégâts parfois irréversibles dus à la dépendance des tourbières vis-à-vis d'une nappe d'eau permanente ne subissant que de très légères variations de niveau au cours de l'année (Lamers *et al.* 2002 ; Frankard 2004).

Outre la destruction des milieux tourbeux, l'abandon des pratiques agropastorales ancestrales comme la fauche des prairies para-tourbeuses humides, principalement depuis le milieu du 20^e siècle, menace les espèces végétales et animales qui leur sont associées (Bergamini *et al.* 2009 ; Cristofoli & Mahy 2010). Les communautés végétales associées, représentées par une végétation pionnière diversifiée, ont fait place à des communautés végétales dominées par un cortège plus pauvre composé d'espèces herbacées ou sociales comme *Molinia caerulea*, *Filipendula ulmaria* ou *Phragmites australis*, voire d'espèces ligneuses (Frankard 2004 ; Verté 2007 ;

1.3. Cadre de l'étude

Van Rossum *et al.* 2012). Kołos & Banaszuk (2013) ont notamment mis en évidence l'impact positif des fauches annuelles sur la richesse spécifique au sein de cariçaies (7 à 10 espèces sans fauche contre 28 à 29 espèces avec fauche). La recolonisation par les ligneux peut également être importante puisque d'une absence totale de zones boisées à la fin du 19^e siècle, leur proportion est de l'ordre de 40% à l'heure actuelle en Haute Semois (Verté 2007).

De plus, la pollution via l'apport d'effluents ou les retombées atmosphériques altère la qualité des eaux et des sols, provoquant une eutrophisation progressive des milieux et altérant la composition des communautés végétales et animales (Verhoeven *et al.* 1993 ; Bobbink & Roelofs 1995 ; Lamers *et al.* 2002). Par exemple, les Hautes Fagnes reçoivent près de 20 *kg* par ha et par an d'azote sous forme nitrique ou ammoniacale et les tourbières du centre des Pays-Bas jusqu'à 150 *kg* (Manneville *et al.* 2006).

Enfin, dans certaines zones tourbeuses, par exemple du plateau des Tailles et de la Haute Semois, se développe une menace croissante, celle des plantes exotiques envahissantes. Deux de ces espèces ont été répertoriées, *Impatiens glandulifera* et *Mimulus guttatus* (observations personnelles). Elles présentent une préférence pour les sols très humides. Ces espèces pourraient dès lors poser un problème de compétition tant pour l'occupation du sol que pour les pollinisateurs avec les espèces rares des marais les plus perturbés (Truscott *et al.* 2006 ; Vervoort *et al.* 2011).

1.3.1.4 Mesures de restauration et d'entretien

A l'échelle européenne, les milieux tourbeux ne sont pas toujours dégradés de manière irréversible et peuvent être restaurés et/ou conservés par le biais de divers projets, dont les projets européens LIFE-Nature qui ont pour but de protéger et de restaurer des habitats rares et vulnérables au niveau européen¹¹.

De par les menaces qui pèsent sur eux et leur marginalité au niveau européen, les milieux tourbeux font partie des biotopes prioritaires dans le cadre du réseau Natura2000¹². En outre, ils ont une grande valeur patrimoniale puisqu'ils abritent de nombreuses espèces rares plus ou moins inféodées à la tourbe (tyrphophiles) et diverses espèces relictées post-glaciaires à affinités boréo-montagnardes (Frankard 2006). A titre d'exemple, plus de 20% des espèces végétales protégées en Wallonie sont susceptibles d'être présentes dans des milieux tourbeux. La plupart de ces espèces sont aussi inscrites dans la Liste Rouge wallonne des espèces végétales (Saintenoy-Simon *et al.* 2006). D'autre part, les tourbières hautes présentent une grande valeur paléo-écologique et archéologique pour l'étude de la succession

11. Programme LIFE : <http://ec.europa.eu/environment/life/index.htm>

12. Liste des biotopes d'intérêt communautaire dans le cadre du réseau Natura2000 : <http://biodiversite.wallonie.be/fr/biotopes-habitats.html?IDC=833>

des climats et des communautés végétales des onze derniers milliers d'années via l'accumulation des pollens et des macrorestes (Damblon 1994 ; Muller *et al.* 2012).

Différentes mesures de gestion de restauration et d'entretien peuvent être envisagées selon les enjeux à atteindre sur un site. Les opérations de restauration du fonctionnement hydraulique des tourbières se font via le colmatage des drains ou le reprofilage des fronts d'exploitation via la pose de seuils. Ces opérations permettent notamment de relever le niveau de la nappe et de restaurer des conditions favorisant à nouveau la formation de tourbe. Le développement de la végétation typique des milieux tourbeux est favorisée par de telles opérations (Lamers *et al.* 2002 ; Zerbe *et al.* 2013). Afin de restaurer la végétation oligotrophe des milieux tourbeux dégradés, l'étrépage, enlèvement de la couche organique du sol sur 5 à 20 *cm* d'épaisseur selon la durée d'abandon, peut être mis en oeuvre en landes tourbeuses et bas-marais (Middleton *et al.* 2006a ; Rasran *et al.* 2007 ; Jacquemart *et al.* 2008). La restauration de la dynamique de la végétation pionnière typique des milieux tourbeux ouverts passe par leur réouverture et leur mise en lumière via la coupe des ligneux (Middleton *et al.* 2006a ; Sundberg 2012). Toutefois, la présence de ligneux augmente la diversité de l'entomo- et de l'avifaune (Söderström *et al.* 2001 ; Taki *et al.* 2010).

L'entretien par la fauche et le pâturage dans les prairies para-tourbeuses humides permet principalement le maintien de l'ouverture des milieux. Le pâturage extensif permet d'augmenter la diversité des communautés végétales et de lutter contre l'envahissement par des espèces sociales telles que *Filipendula ulmaria*, dont les racines ne résistent pas au piétinement. D'autre part, le pâturage permet d'améliorer la dissémination des graines par le bétail via les excréments ou les poils (Adler *et al.* 2001 ; Reitalu *et al.* 2010 ; Rosenthal *et al.* 2012). La fauche avec exportation permet l'entretien de l'ouverture du milieu pour les espèces pionnières et la restauration de conditions oligotrophes entraînant une augmentation progressive du nombre d'espèces (Kołos & Banaszuk 2013).

1.3.1.5 Description des régions étudiées

1.3.1.5.1 Le plateau des Tailles

Le plateau des Tailles fait partie des hauts plateaux ardennais qui comprennent également les plateaux des Hautes Fagnes et de Saint-Hubert, et le massif de la Croix-Scaille (Figure 1.3 ; Frankard 2004 ; Manneville *et al.* 2006). Il est situé en Ardenne septentrionale à la fois sur les provinces de Liège et du Luxembourg dans le district phytogéographique ardennais et s'étend sur près de 700 ha (Mullenders 1954 ; Jacquemart *et al.* 2008). L'altitude du plateau des Tailles est partout supérieure à 400 *m* et culmine à 652 *m* au lieu-dit de la Baraque de Fraiture. Le relief pénéplané du plateau des Tailles est l'une des causes de l'abondance des tourbières qui se rencontrent toutes au-dessus de 550 *m* d'altitude (Jacquemart *et al.*

1.3. Cadre de l'étude

2008). Landes tourbeuses, tourbières et bas-marais acides, tourbières boisées et mégaphorbiaies y alternent. Toutes les roches constitutives du plateau sont acides (pH entre 4,5 et 5,5) et oligotrophes. Ceci explique la très faible dureté des eaux (entre 0,16 et 0,39 mq/l ; Lamens *et al.* 1986; Jacquemart *et al.* 2008).

TABLE 1.1: *Données climatiques relatives aux deux régions étudiées, le plateau des Tailles et les marais de la Haute Semois (1901-1930) comparées aux données climatiques relevées à Uccle pour la même période (Poncelet 1947).*

	Uccle	Plateau des Tailles	Haute Semois
Pluviosité annuelle (mm)	800-900	1320-1430	1100-1200
Température moyenne annuelle ($^{\circ}C$)	9,5	6,5-7,0	7,5
Nombre moyen annuel de jours de gelée	50	120	110

Les crêtes ardennaises, dont fait partie le plateau des Tailles, sont caractérisées par un climat froid et humide, avec des précipitations et une humidité élevées tout au long de l'année (Poncelet 1947; Malbrouck & De Sloover 1989; Jacquemart *et al.* 2008). Les précipitations annuelles moyennes varient entre 1000 mm dans les vallées et 1400 mm sur les points culminants (Tableau 1.1). De ce fait, on enregistre en moyenne 198 jours de précipitations par an et rarement plus de 6 jours secs consécutifs au plateau des Tailles (Jacquemart *et al.* 2008). Ce phénomène induit également une fréquence élevée de brouillard, quelle que soit la saison.

1.3.1.5.2 La Haute Semois

Les marais de la Haute Semois se situent dans le Sud de la province du Luxembourg dans le district phytogéographique lorrain, dans le secteur écologique des « Vallées supérieures de la Semois et de l'Attert » à une altitude moyenne de 350 m (Figure 1.3(a)); Onclincx *et al.* 1987; Tanghe & Herremans 1990). Ils occupent les dépressions marneuses hettangiennes de la Semois au pied de la cuesta sinémurienne constituée de grès calcarifère (Tanghe & Herremans 1990; Jacob & Remacle 2005). Il s'agit du dernier ensemble conséquent de tourbières alcalines de Wallonie puisque les zones humides s'étendent sur plus de 500 ha. Les dernières zones tourbeuses alcalines de Flandre sont représentées par des fragments situés principalement en Campine (Decler 2008). Les marais de la Haute Semois forment un vaste complexe où alternent bas-marais acides ou alcalins, mégaphorbiaies, forêts marécageuses et alluviales, et prairies humides (Verté 2007; Van Rossum *et al.* 2012).

De par leur localisation en Lorraine belge, les marais de la Haute Semois jouissent d'un climat de transition entre l'Ardenne et les parties plus méridionales de la Lorraine. Cette région située au Sud des massifs ardennais présente une pluviosité inférieure à ces derniers (1100-1200 mm) et est protégée des vents du Nord (Poncelet 1947; Tableau 1.1). Le climat y est semi-continental, ce qui se traduit par des

hivers froids et humides, cependant plus courts qu'en Ardenne, mais des étés plus chauds et secs avec seulement 250 *mm* de pluie en saison de végétation (Colasse 1998).

1.3.1.5.3 Protection et gestion

La création de la Réserve Naturelle Domaniale (RND) du plateau des Tailles a débuté en 1967 par la protection de 14 ha de landes tourbeuses de la Grande Fange (Jacquemart *et al.* 2008). Plusieurs arrêtés, dans les années 1970, ont suivi cette décision de mise en réserve et ont étendu la superficie de la réserve. Depuis 1999, la superficie totale de la RND du plateau des Tailles s'élève à un peu plus de 682 ha et inclut les principaux sites tourbeux (Jacquemart *et al.* 2008). La surface occupée par les milieux tourbeux dans la région du plateau des Tailles continue de s'étendre, notamment via l'action de deux projets LIFE-Nature. Le premier s'est déroulé entre 2006 et 2010 (LIFE plateau des Tailles - LIFE05 NAT/B/000089) et le second est en cours depuis 2012 (LIFE Ardennes liégeoises - LIFE10 NAT/B/000706).

Les premières actions de conservation et de restauration des marais de la Haute Semois débutent en 1965 dans le marais de Vance via la signature d'un bail de gestion en faveur des Réserves Naturelles et Ornithologiques de Belgique (RNOB ; Tanghe & Herremans 1990). A l'heure actuelle, cinq grands types de propriétaires se distinguent au sein de la zone centrale des 500 ha des marais de la Haute Semois : la Région wallonne (4%), les communes (9%), la Défense Nationale (camp militaire de Lagland ; 16%), les Réserves naturelles RNOB (20%) et enfin de nombreux propriétaires privés (51% ; Verté 2007).

Les opérations de gestion sont sensiblement les mêmes dans les deux régions d'étude et toutes définies selon un plan de gestion. Après restauration, des opérations de maintien des niveaux d'eau, de fauche et de pâturage extensif (ovin, bovin ou équin selon les conditions du milieu) sont mises en place de manière à favoriser les communautés végétales inféodées à ces milieux tourbeux (Frankard 2004 ; Verté 2007 ; Jacquemart *et al.* 2008 ; Van Rossum *et al.* 2012).

1.3.2 Modèle biologique : *Comarum palustre* L.

1.3.2.1 Taxonomie

Le genre *Comarum* ne comprend que l'espèce *C. palustre* L. et *C. salesowianum* (Stephan) Aschers. et Graebn. des montagnes de l'Asie centrale (Lawalrée 1961). L'espèce concernée par cette thèse est le comaret, *Comarum palustre* L. Elle a de nombreux synonymes nomenclaturaux tels que *Potentilla palustris* (L.) Scop., *Potentilla comarum* Nestl. ou encore *Fragaria palustris* Cr. (Camus 1921 ; Lambinon &

1.3. Cadre de l'étude

Verloove 2012). Sur base de séquences ITS (Internal Transcribed Spacers)¹³ et de la région TRNL/F de l'ADN chloroplastique, Eriksson *et al.* (2003) ont confirmé que le genre *Comarum* était différent des genres *Potentilla* et *Fragaria*.

1.3.2.2 Description botanique

1.3.2.2.1 Système caulinaire

Comarum palustre atteint une hauteur variant entre 15 et 50 *cm* avec une croissance journalière d'environ 10 *mm* durant la saison de végétation (Macek & Lepš 2007 ; Lambinon & Verloove 2012). Il s'agit d'une plante herbacée, à partie inférieure presque ligneuse et rampante dans sa moitié inférieure (Camus 1921 ; Lawalrée 1961 ; Aiken *et al.* 2003). Les tiges ascendantes sont pubescentes, rougeâtres et feuillées sur toute leur longueur (Camus 1921 ; Figure 1.4).

Les feuilles alternes sont pennatiséquées, imparipennées en cinq ou sept folioles ovales-oblongues de 15 à 50 *mm* de long et de 10 à 20 *mm* de large, pour les feuilles inférieures (Camus 1921 ; Aiken *et al.* 2003 ; Figure 1.4) et imparipennées en trois folioles pour les feuilles supérieures (Camus 1921). Elles sont vertes sur leur face adaxiale, blanchâtres et chargées d'un duvet très court sur leur face abaxiale (Lawalrée 1961). Le bord du limbe est fortement denté et les nervures sont bien visibles sur les deux faces (Camus 1921 ; Aiken *et al.* 2003). A la base du pétiole, on retrouve des stipules marcescentes de couleur rose ou rougeâtre, glabres ou poilues, non engainantes, de 2 à 6 *mm*, et soudées (Aiken *et al.* 2003).

1.3.2.2.2 Système reproducteur

L'inflorescence de *C. palustre* est une cyme lâche ramifiée comportant un à cinq noeuds (Figure 1.5). Les fleurs actinomorphes, mesurant de 28 à 45 *mm* de diamètre, sont ouvertes et pentamères à larges sépales rouges-bruns (10 à 17 *mm* de long sur 4 à 8 *mm* de large) et pétales pourpres, libres et de petite taille (5 à 9 *mm* de long sur 2 à 4 *mm* de large), avec en leur centre un épicalice (Camus 1921 ; Olesen & Warncke 1992 ; Aiken *et al.* 2003).

Du nectar est sécrété à partir d'un disque nectarifère situé entre le périanthe et les étamines (Olesen & Warncke 1992 ; Figure 1.6). Le nombre d'étamines varie entre 15 et 25, pouvant atteindre exceptionnellement 30. Lors de l'ouverture de la fleur, les anthères non matures sont de couleur pourpre foncé, de forme ellipsoïdale et mesurent de 1 à 1,2 *mm* de long. Elles sont disposées parallèlement aux styles de telle façon qu'elles touchent les stigmates. Au moment de l'anthèse, les anthères matures s'écartent selon une disposition radiale autour des stigmates encore non

13. Séquence ITS = Espaceur interne transcrit : région non codante et hautement polymorphe de l'ADN ribosomique fréquemment utilisée en biologie cellulaire pour mettre en évidence une différence génétique entre deux espèces

réceptifs. Au centre de l'hypanthium¹⁴, se trouve un réceptacle hémisphérique, accrescent devenant spongieux à maturité et voûté, portant de nombreux carpelles, en moyenne 312 ± 20 pour les fleurs basales de l'inflorescence et 97 ± 5 pour les fleurs en position distale (Olesen & Warncke 1992).

Chaque ovaire, supère, possède un style court avec un seul stigmate et ne comprend qu'un ovule. Le faux-fruit de 8 à 12 *mm* de long sur 10 à 15 *mm* de large, consiste en un polyakène, fascicule d'akènes brunâtres glabres, capables de flotter à la surface de l'eau (Camus 1921 ; Lawalrée 1961 ; Olesen & Warncke 1992 ; Aiken *et al.* 2003 ; Guillén *et al.* 2005).

1.3.2.2.3 Phénologie et reproduction

Comarum palustre se répand aussi bien par multiplication végétative, via rhizomes, que par reproduction sexuée, par la production d'akènes (Olesen & Warncke 1992 ; Macek & Lepš 2007). La floraison s'étend de mai à juillet (Lawalrée 1961 ; Lambinon & Verloove 2012). La floraison se déroule de manière acropète, c'est-à-dire que les fleurs basales s'ouvrent avant les fleurs distales. Les fleurs de *C. palustre* sont protandres (Lawalrée 1961). La durée de vie d'une fleur est en moyenne de cinq jours au cours desquels la phase femelle suit la phase mâle deux jours après l'anthèse (Figure 1.6). Il s'agit d'une moyenne car la durée de vie d'une fleur diminue au cours de la période de floraison (Olesen & Warncke 1992).

Le nombre de fleurs ouvertes selon leur position dans l'inflorescence varie au cours de la période de floraison. Pour une floraison s'étalant sur 2 mois, le pic se situe entre 3 et 4 semaines après le début de celle-ci avec en moyenne 6,8 fleurs en anthèse (entre 1 et 20) par inflorescence. Le nombre d'akènes produites varie de 160 akènes par faux-fruit en début de floraison à 20 akènes lors de la fin de floraison (Olesen & Warncke 1992). Au cours de la maturation de l'infrutescence, le réceptacle hémisphérique perd peu à peu de sa turgescence et finit par se déchirer, permettant aux akènes de se détacher (Figure 1.6). Finalement, la rupture du calice, causée par des facteurs atmosphériques, permettra la libération des akènes (Guillén *et al.* 2005).

1.3.2.2.4 Multiplication végétative

Comarum palustre se caractérise par la présence d'un rhizome de 2 à 4 *mm* de diamètre, ligneux et fortement ramifié permettant une multiplication végétative (Olesen & Warncke 1992 ; Aiken *et al.* 2003). Des racines adventives sont produites tout le long du rhizome. Certaines s'enfoncent dans le substrat et forment alors des racines latérales. En raison de son habitat aquatique et de la rapidité avec laquelle

14. Hypanthium : structure typique de la famille des Rosacées résultant de la fusion de la base des pétales, des sépales et des étamines.

1.3. Cadre de l'étude

progressive et se décompose son rhizome, *C. palustre* présente une faible capacité d'ancrage via ses racines adventives (Camus 1921).

1.3.2.3 Distribution

Comarum palustre a une distribution principalement boréo-alpine. L'espèce se retrouve au sein des zones tempérées et froides de l'Hémisphère Nord, en Europe septentrionale et médiane, de l'Islande et de l'Arctique jusqu'aux montagnes de l'Espagne, de l'Italie septentrionale, du Nord des Balkans et du Caucase (Lawalrée 1961 ; Hultén & Fries 1986). Dans le reste de l'Hémisphère Nord, elle est présente au Groenland, au Canada, aux Etats-Unis et en Asie occidentale et septentrionale (Camus 1921 ; Aiken *et al.* 2003 ; Figure 1.7). De plus, rare en plaine, le comaret devient commun en montagne, par exemple de 1500 à 2100 m dans les Alpes (Camus 1921 ; Lawalrée 1961).

En Belgique, il s'agit d'une plante relictive, indigène, que l'on retrouve essentiellement en deux districts phytogéographiques où elle est assez commune à assez rare selon la station, à savoir le Campinien et l'Ardennais, où se situe le plateau des Tailles. Dans le district Lorrain, où se situent les marais de la Haute Semois, elle est désignée comme étant rare à très rare (Lawalrée 1961 ; Lambinon & Verloove 2012 ; Figure 1.7).

1.3.2.4 Biotopes

Comarum palustre se retrouve dans les milieux humides à niveau trophique modéré au moins temporairement inondés tels les marais tourbeux (Olesen & Warncke 1992), voire dans des milieux à niveau trophique élevé (Aiken *et al.* 2003). Elle se rencontre également dans les prairies marécageuses et les zones humides imparfaitement drainées (Lawalrée 1961 ; Aiken *et al.* 2003). De par son comportement d'hélophyte¹⁵, elle peut s'ancrer sur les berges des mares et finit par coloniser les plans d'eau les moins profonds en créant un tapis de rhizomes extrêmement dense (Macek & Lepš 2007).

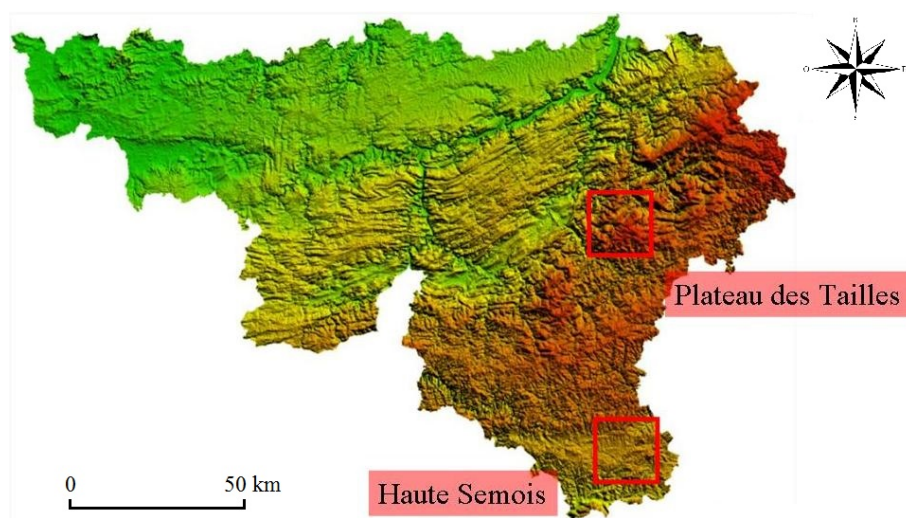
Comarum palustre est une espèce acidiphile qui pousse sur des sols tant sableux qu'argileux, limoneux ou tourbeux (Aiken *et al.* 2003 ; Lambinon & Verloove 2012). Ce besoin en substrat acide à contenu nutritif modéré conditionne sa distribution. En effet, cette gamme de substrats ne se retrouve qu'en de rares régions sur sols tourbeux.

Comarum palustre se retrouve souvent en association avec *Menyanthes trifoliata*, le trèfle d'eau, au sein du *Caricion lasiocarpae* présent essentiellement en prairies

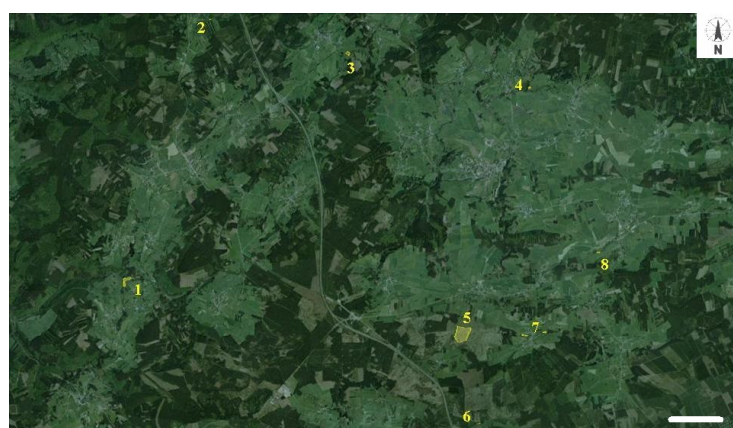
15. Espèce hélophyte : espèce végétale enracinée sous l'eau et dont les parties supérieures sont aériennes

flottantes dans les tourbières, dans les bas-marais ou au bord d'étangs tourbeux et de rivières (Lebrun *et al.* 1949 ; Catteau & Duhamel 2000). La cariçaie se caractérise par une végétation dense pouvant atteindre une hauteur de 1,5 m. Il est à noter que les cariçaies les plus inondées sont généralement caractérisées par une végétation moins dense, mais sont plus riches en espèces (Bournérias *et al.* 2001). *Comarum palustre* se retrouve également au sein du *Caricion davallianae* caractérisé par une végétation de tourbières neutro-alkalines à pleurocarpes (essentiellement *Cladium mariscus*, *Lysimachia vulgaris* et *Lythrum salicaria* ; Lebrun *et al.* 1949 ; Bournérias *et al.* 2001). L'évolution naturelle de ces associations est la roselière haute *Phragmites communis*, composée d'un cortège floristique plus pauvre. En tant qu'espèce pionnière, l'abondance de *C. palustre* diminue avec la fermeture du couvert via des rejets ligneux ou l'envahissement du milieu par des espèces herbacées hygrophiles à hygroclines (Catteau & Duhamel 2000 ; Bournérias *et al.* 2001). Le maintien des cariçaies nécessite des actions d'entretien de l'ouverture du milieu et de mise en lumière pour les espèces les plus discrètes telles que *C. palustre* (Bournérias *et al.* 2001). Toutefois, Macek & Lepš (2007) ont montré une influence positive de la hauteur de la végétation environnante sur le nombre de fleurs par inflorescence de *C. palustre*.

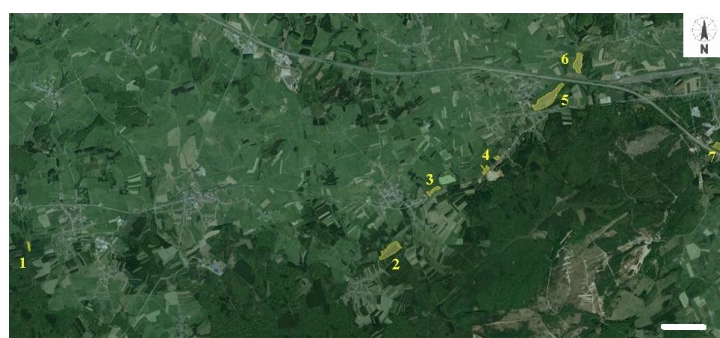
1.3. Cadre de l'étude



(a)



(b)



(c)

FIGURE 1.3: Localisation des deux régions étudiées, le plateau des Tailles et les marais de la Haute Semois et des sites d'études au sein des deux régions. Le trait blanc correspond à une distance de 1 km. (Source : Google Earth)



FIGURE 1.4: Système caulinaire de *Comarum palustre* : port global (a) de la partie basale ligneuse et rampante et (b) d'une tige ascendante, (c) feuille pennatiséquée (photographies : L. Somme). Le trait blanc correspond à 4 cm.

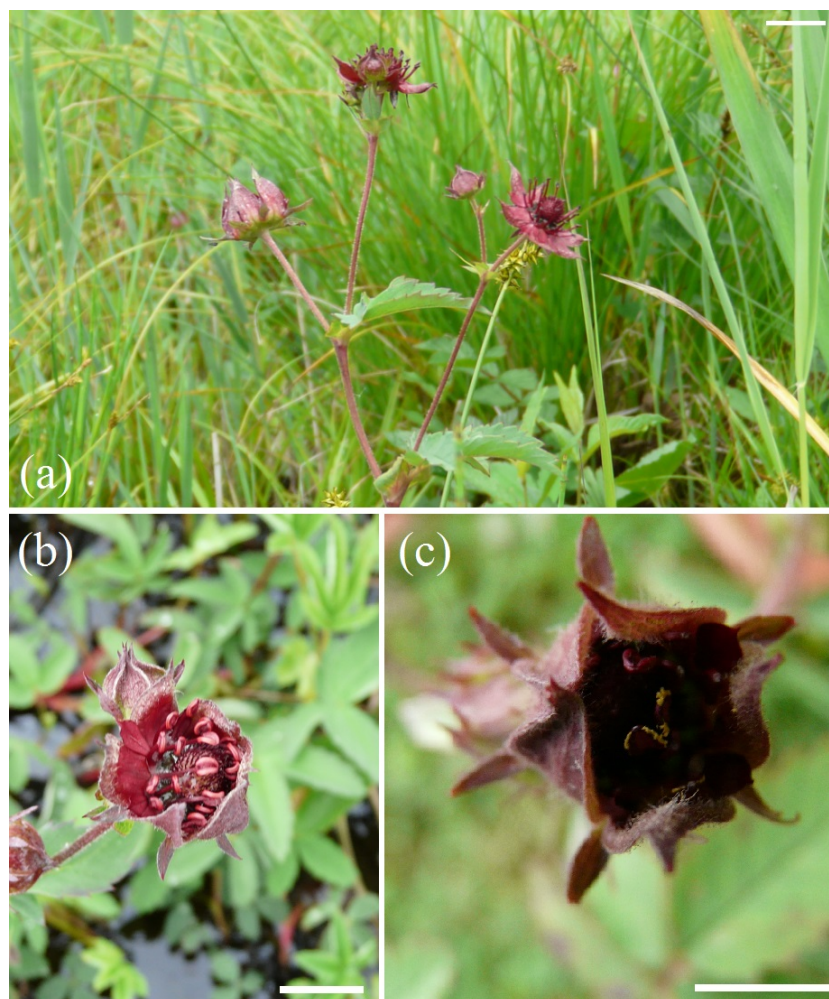
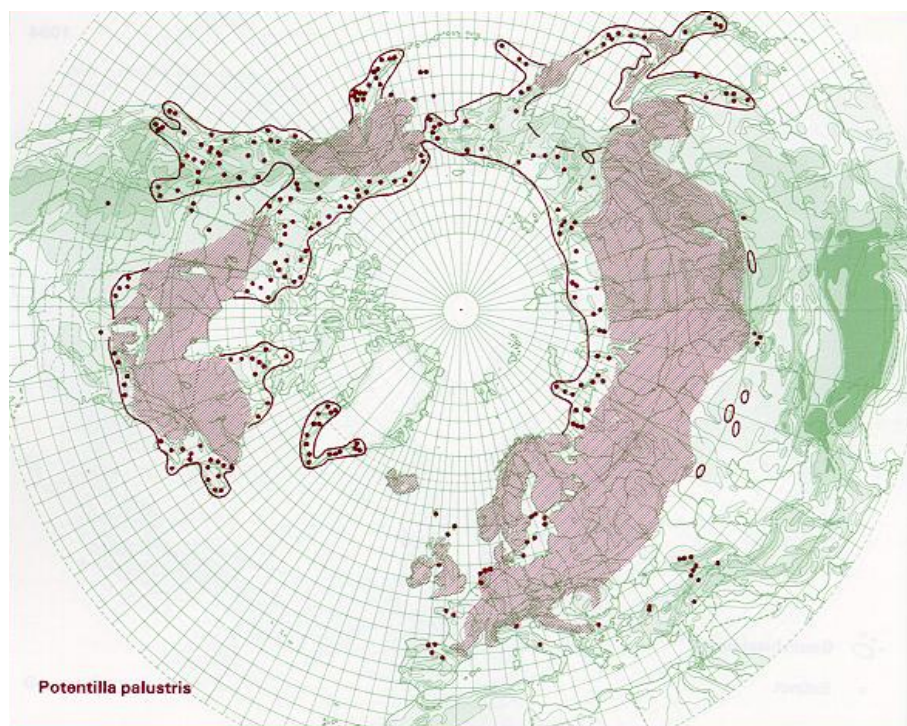


FIGURE 1.5: *Disposition générale de l'inflorescence de Comarum palustre et disposition des étamines par rapport aux stigmates au début de l'anthèse (photographies : L. Somme). Le trait blanc correspond à 3 cm.*

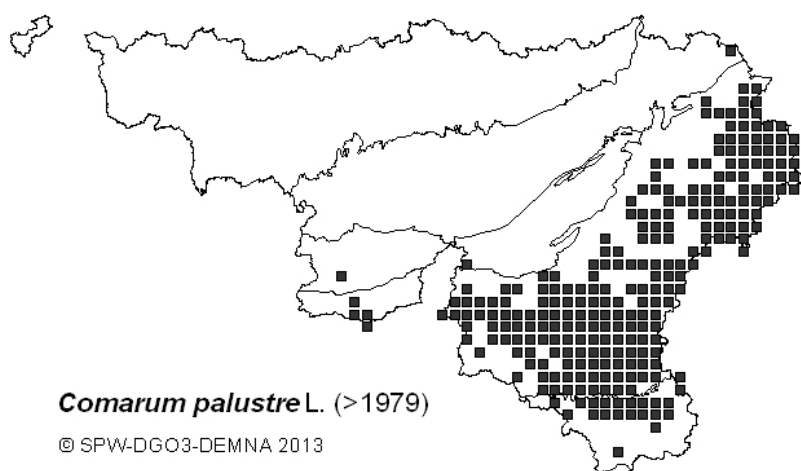


FIGURE 1.6: Morphologie florale de *C. palustre* : stades floraux mâle (a) et femelle (b), sécrétions nectarifères (c), boutons floraux (d) et polyakène (e ; photographies : L. Somme). Le trait blanc correspond à 2 cm.

1.3. Cadre de l'étude



(a)



(b)

FIGURE 1.7: Aire de distribution de *Comarum palustre* (a) dans l'Hémisphère Nord (1950; Hultén & Fries 1986) et (b) en Région wallonne après 1979 (SPW-DGO3-DEMNA, 2013).

1.4 Objectifs de la thèse

Dans un contexte de destruction et de fragmentation des habitats, et de perte de biodiversité, l'objectif central de cette thèse est de caractériser l'état de conservation des populations de *C. palustre* en Belgique ainsi que les interactions existant entre l'espèce et ses pollinisateurs. L'hypothèse principale est que la fragmentation des habitats a un impact négatif sur les pollinisateurs, induisant le déclin des espèces végétales dépendant de leurs services. La perte des pollinisateurs serait à l'origine de la perturbation des processus de pollinisation dans les populations végétales isolées et/ou de petite taille, accélérant ainsi l'isolement génétique et/ou l'extinction de ces dernières. Les objectifs de cette thèse se répartissent entre les deux partenaires impliqués dans les relations plantes-pollinisateurs : les insectes et *Comarum palustre*.

1.4.1 Les insectes pollinisateurs

L'étude de l'impact de la fragmentation sur les insectes pollinisateurs de *C. palustre* est divisée en deux objectifs principaux (Figure 1.9). D'une part, la modification de la structure spatiale de l'habitat induite par la fragmentation ayant un effet sur les populations animales et leur dispersion, existe-t-il un **effet de la fragmentation des populations de *Comarum palustre***, c'est-à-dire une diminution de leur superficie, une augmentation de l'isolement et de l'effet de bordure, **sur la communauté des insectes pollinisateurs** dans ces fragments. Au sein des populations, existe-t-il une influence de la **densité de fleurs** de *C. palustre* sur les insectes pollinisateurs ? L'hypothèse avancée est que la diminution de la densité florale au sein des populations et de la superficie des populations ainsi que l'augmentation de l'isolement et de l'effet de bordure des populations de *C. palustre* entraînent une diminution de l'abondance et du taux de visite des insectes pollinisateurs.

D'autre part outre la modification de la structure spatiale de l'habitat, une des causes principales du déclin des pollinisateurs dans les régions tempérées est la diminution des ressources florales et leur homogénéisation. Dans le but de maintenir les populations d'insectes pollinisateurs afin d'assurer le service de pollinisation dans les milieux fragmentés, il est primordial d'y étudier leur réseau alimentaire. Quelles sont donc les **principales espèces végétales visitées par les pollinisateurs majoritaires** des populations de *C. palustre* ? Quelle est la **composition de leurs ressources florales**, à savoir le nectar et le pollen ? Existe-t-il une **influence** de leur composition, c'est-à-dire **de leur qualité, sur l'attractivité de ces espèces végétales** vis-à-vis des principaux pollinisateurs de *C. palustre* ? L'hypothèse est que la fidélité des pollinisateurs principaux vis-à-vis de *C. palustre* dépend de la qualité nutritionnelle des autres ressources florales présentes.

1.4.2 L'espèce végétale

Les objectifs concernant l'espèce végétale se répartissent autour de deux grands axes : d'une part, la caractérisation de sa biologie de la reproduction, et d'autre part, la caractérisation de la structure et de la diversité génétique, ainsi que les flux de gènes dans les populations (Figure 1.9).

La diminution de l'abondance et du taux de visite des insectes pollinisateurs sont reportées comme ayant un impact négatif sur le succès reproducteur des espèces végétales via une limitation du transfert de pollen. Dans les populations de *C. palustre* étudiées, **l'effet de la diminution du succès reproducteur** de l'espèce suite à la **diminution des insectes pollinisateurs** se vérifie-t-elle ?

De plus, lorsque les insectes pollinisateurs collectent les ressources florales, ils ont tendance à visiter les fleurs séquentiellement. Ce comportement augmente la probabilité de dépôt de pollen entre fleurs d'un même individu et mène à la gitonogamie dans le cas d'espèces auto-compatibles. Le succès reproducteur de l'espèce peut être influencé selon l'origine du pollen, c'est-à-dire présenter des signes de dépression de consanguinité. *Comarum palustre* est-elle principalement autogame ou allogame ? **Le mode de reproduction influence-t-il le succès reproducteur ?** L'hypothèse émise est que la mise à graines est plus faible après autogamie que par allogamie pour cette espèce.

La fragmentation des habitats, la diminution du succès reproducteur et du recrutement de plantules d'une espèce végétale peuvent induire une réduction du nombre d'individus présents au sein des populations ainsi qu'un appauvrissement de la diversité génétique de ces populations. Quel est **l'état actuel des populations de *C. palustre*** du point de vue de la **diversité génétique** ? Existe-t-il un **impact de la fragmentation sur la diversité génétique** des populations de *C. palustre* ? L'hypothèse est que la diversité génétique dépend de la taille de la population. Toutefois, il semble que la capacité de multiplication végétative permette de postposer l'impact de la fragmentation sur la diversité génétique des populations.

La multiplication végétative permet également d'augmenter le nombre d'inflorescences d'un individu. Comme évoqué précédemment, les pollinisateurs ont tendance à visiter séquentiellement les fleurs de proche en proche. **La multiplication végétative de *C. palustre* influence-t-elle son mode de reproduction ?** En particulier, l'hypothèse est que l'architecture spatiale de type phalange des individus et l'augmentation de leur taille ont un impact négatif sur leur succès reproducteur via une diminution du taux d'allogamie.

Enfin, la distance entre individus au sein d'un fragment pourrait avoir une influence sur la dispersion du pollen allogame en raison du comportement des pollinisateurs. De ce fait, existe-t-il une **influence de la distribution spatiale des individus** au sein des populations de *C. palustre* sur la **dispersion du pollen allogame** ?

L'étude a été réalisée sur un total de 14 sites répartis sur deux régions en Belgique distantes d'environ 60 *km*, le plateau des Tailles et la Haute Semois. Ces deux régions présentent des milieux tourbeux humides fragmentés accueillant des populations de *C. palustre* et dont les conditions édaphiques sont différentes. Ces deux régions font l'objet de mesures de conservation, d'entretien et de restauration contrastées. L'impact de ces mesures sur les populations de *C. palustre* et de ses principaux pollinisateurs sera discuté.

Le sujet de thèse s'est inscrit dans le cadre d'un projet financé par le FNRS (FRFC n°2.4540.09 - Facteurs-clés pour la persistance de populations fragmentées d'espèces végétales rares ou en régression et de leurs pollinisateurs préférentiels) qui s'est déroulé de 2009 à 2012. Trois institutions ont pris part à ce projet : l'UCL, l'UMons (Denis Michez) et le Jardin botanique national de Belgique (Olivier Raspé et Fabienne Van Rossum). Les objectifs de départ étaient d'identifier les facteurs-clés dans la persistance des populations fragmentées d'espèces végétales entomophiles rares ou en régression partageant un même biotope et de confronter les résultats avec la structure des communautés de leurs principaux pollinisateurs. L'hypothèse principale était que, dans un paysage fragmenté, le déclin des pollinisateurs précède celui des espèces végétales dépendant de leurs services. Pour tester cette hypothèse, quatre espèces végétales présentant des modes de reproduction (auto-compatible vs. auto-incompatible) et un degré de spécialisation (spécialiste vs. généraliste) différents ont été choisies : *Comarum palustre* (Rosacées), *Menyanthes trifoliata* (Ményanthacées), *Vaccinium uliginosum* (Ericacées) et *V. oxycoccos* (Ericacées ; Figure 1.8). Ce projet aura des implications en matière de conservation comme la mise en place ou l'amélioration de protocoles de gestion pour la restauration des populations.

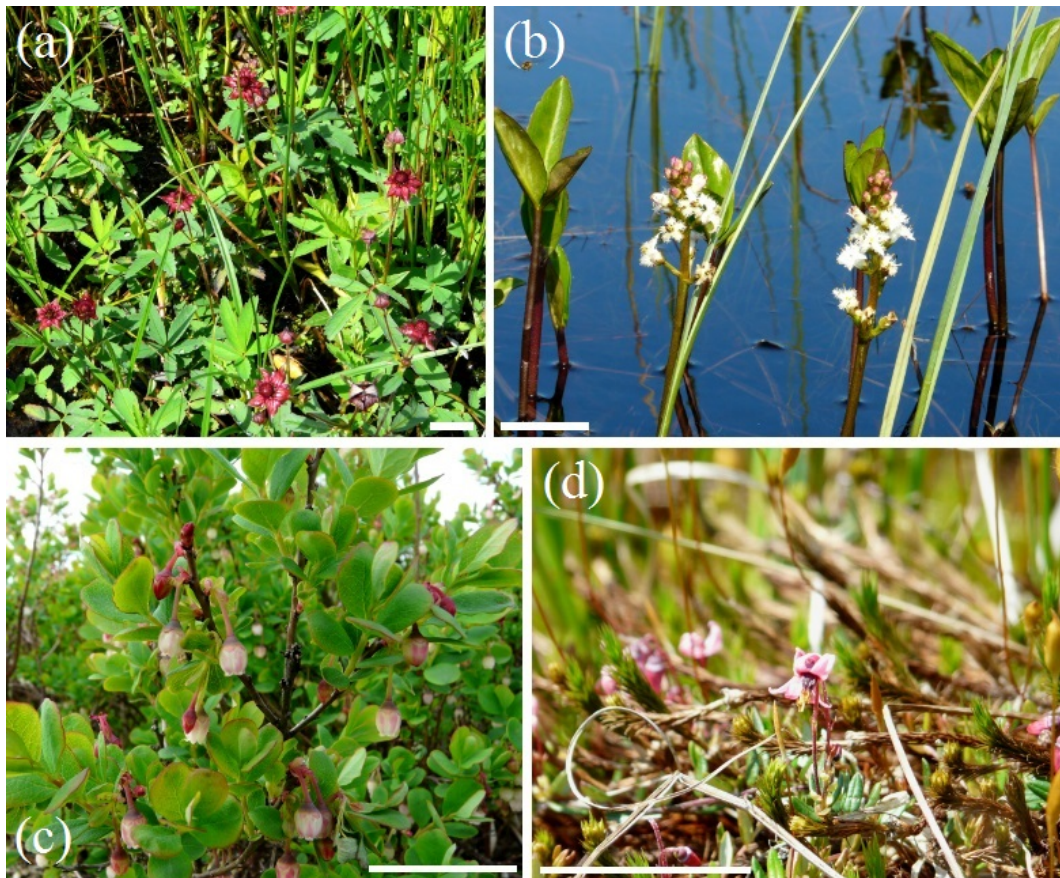


FIGURE 1.8: Modèles biologiques choisis pour le projet FRFC n°2.4540.09 : (a) *Comarum palustre*, (b) *Menyanthes trifoliata*, (c) *Vaccinium uliginosum* et (d) *V. oxycoccos*. Le trait blanc correspond à 4 cm. (photographies : L. Somme)

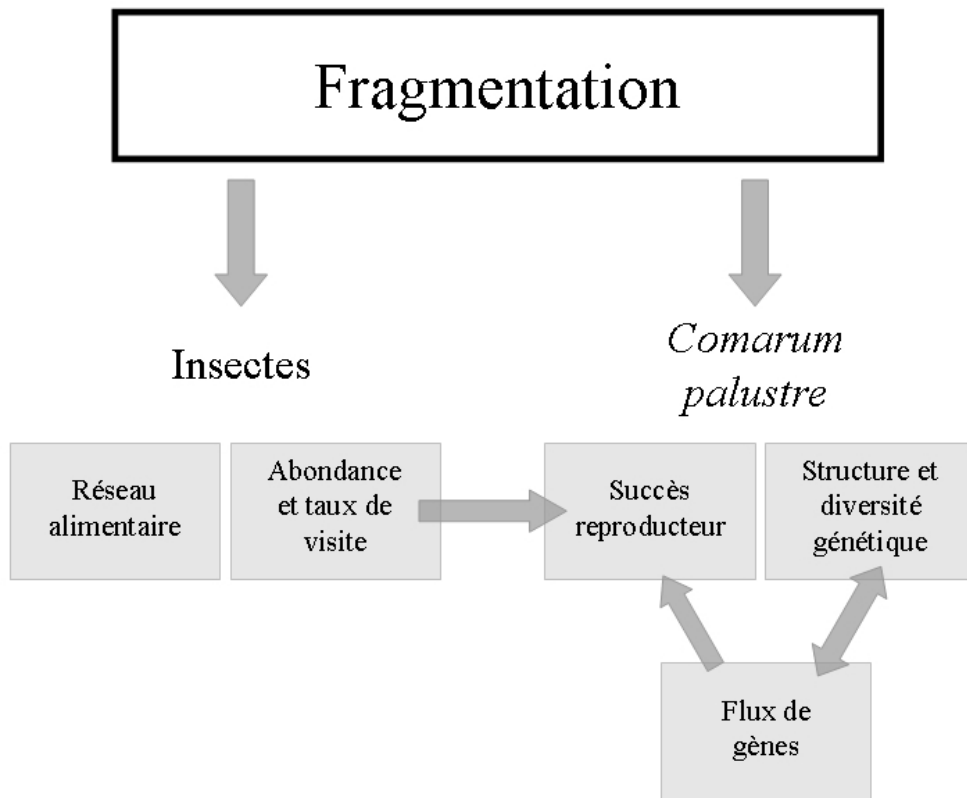


FIGURE 1.9: Organisation des objectifs relatifs aux insectes et à *Comarum palustre* dans le contexte de la fragmentation des habitats. Les figures en début de chapitres permettront de situer chacun d'eux par rapport aux objectifs de cette thèse.

1.5 Plan de thèse

Le corps de cette thèse se compose de deux parties reprenant les objectifs précédemment définis, d'une part la caractérisation de la pollinisation entomophile et d'autre part la caractérisation de la génétique des populations.

Dans la première partie relative à la caractérisation de la pollinisation entomophile, le chapitre 2 intitulé « Multilevel spatial structure impacts on the pollination services of *Comarum palustre* (Rosaceae) » s'articule autour de l'efficacité des pollinisateurs vis-à-vis du succès reproducteur de *C. palustre*. En tant qu'espèce entomophile, sa pollinisation est intimement liée aux insectes qui dépendent d'habitats adéquats pour leur reproduction et leur alimentation. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de la densité florale, de la superficie, de l'isolement et de l'effet de bordure des populations de *C. palustre* sur l'abondance de ses pollinisateurs principaux (bourdons et abeilles solitaires). Dans un second temps, nous avons déterminé l'impact du taux de visite des pollinisateurs principaux sur le succès reproducteur de *C. palustre*.

Le chapitre 3 intitulé « Pollen and nectar quality drive major and minor floral choices of bumble bees » s'articule autour de la composition des ressources florales de *C. palustre* et leur attractivité vis-à-vis de ses pollinisateurs principaux et de leurs choix floraux. Les ressources florales (pollen et nectar) représentent les principales ressources alimentaires pour les insectes pollinisateurs. La diversité et la composition de ces ressources influence la diversité et l'abondance des pollinisateurs, en particulier les espèces du genre *Bombus*. Nous avons donc étudié la composition du pollen (polypeptides, acides aminés et stérols) ainsi que la production et la composition du nectar (glucides) de sept espèces végétales faisant partie du réseau de pollinisation de quatre espèces majoritaires de bourdons afin d'estimer l'impact de la qualité des ressources sur les choix floraux de ces espèces.

Dans la seconde partie, relative à la caractérisation de la génétique des populations de *C. palustre*, le chapitre intitulé « Development and multiplexing of microsatellite markers using pyrosequencing in the clonal plant *Comarum palustre* (Rosaceae) » détaille le protocole et les tests préliminaires mis en place pour la mise au point de marqueurs génétiques indispensables pour l'approche génétique abordée au chapitre 5. La mise au point de marqueurs microsatellites a été réalisée selon une nouvelle méthode de pyroséquençage. Leur mise au point a permis le génotypage des individus de *C. palustre*.

Le dernier chapitre du corps de thèse intitulé « Influence of spatial distribution and size of clones on the realized outcrossing rate of the marsh cinquefoil (*Comarum palustre*) » s'articule autour de la structure et de la diversité génétique des populations de *C. palustre* et son influence sur les flux de gènes. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'effet de la taille, de la distribution spatiale et de la structure

des clones sur le taux d'allogamie réalisé de *C. palustre*. A l'aide de tests de paternité, nous avons également caractérisé les flux de gènes, via le pollen et les graines, à l'échelle des populations.

Dans la discussion générale, ces différentes approches permettront de caractériser les facteurs de la persistance des populations de *C. palustre* dans un paysage fragmenté.

Première partie

Caractérisation de la pollinisation entomophile

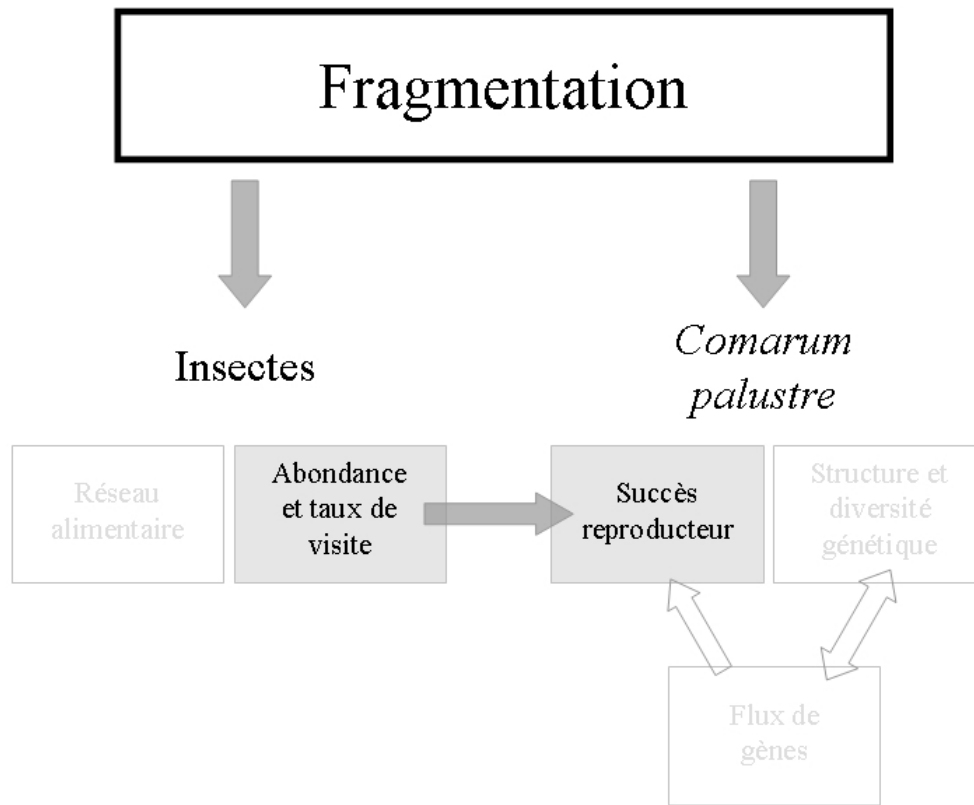


FIGURE 1.10: La destruction et la fragmentation des habitats représentent les principales causes du déclin des pollinisateurs. Ce déclin perturbe les processus écosystémiques tels que la pollinisation. Ce chapitre décrit l'impact de la structure spatiale sur la communauté des pollinisateurs de *Comarum palustre* dans 14 populations à trois niveaux : au sein de la population via la densité de fleurs, au niveau de la population via le degré d'ouverture (i.e. proportion de lisières) et sa surface, et au niveau du paysage (i.e. proportion de zones boisées dans un rayon de 500 m). Le succès reproducteur de l'espèce végétale a été estimé par pollinisation manuelle supplémentaire.

Chapitre 2

Multilevel spatial structure impacts on the pollination services of *Comarum palustre* (Rosaceae)¹

2.1 Abstract

Habitat destruction and fragmentation accelerate pollinator decline, consequently disrupting ecosystem processes such as pollination. To date, multilevel spatial structure impacts on pollination services have rarely been addressed. We focused on the effects of spatial structure of plant populations at three levels (i.e. flower density within populations, population characteristics and landscape) on pollination services in wetlands, recognized as threatened species-rich habitats. Over three years, we investigated a total of 14 Belgian populations of *Comarum palustre*. They differed in their within-population plot flower density, population surface, closure (i.e. proportion of forest edges) and isolation (i.e. percentage of woody area cover in a 500 m radius). We tested whether these characteristics negatively impact on pollinator abundances and visitation rates and thus, reproductive success of *C. palustre*. Insect visitors were observed in random plots within each population. We tested for pollen limitation with supplemental hand cross-pollination. Bumble bees and solitary bees were the major pollinators through all populations. Within populations, plots with high flower densities attracted high numbers of bumble bees and other insects. High bumble bee and solitary bee abundance was observed in populations presenting high proportions of

1. Somme, L., Mayer, C., and Jacquemart, A.L. PLoS ONE soumis 1er juin 2013

forest edges and in populations within landscapes presenting high proportions of woody areas. Seed set following open pollination varied with the visitation rate of bumble bees and solitary bees, leading to pollen limitation. Within-population plot flower density, forest edges and woody areas at the landscape level were determining factors for pollinator abundance. Since the reproductive success might depend on visitation rates of the main pollinators, landscape and habitat structure require special attention in wetland management plans.

2.2 Introduction

Pollinators play an important functional role in most terrestrial ecosystems and are vital to the maintenance of plant communities (Aguilar *et al.* 2006 ; Potts *et al.* 2010). In particular insects are the primary pollinators of 80% of wild plant species (Aguilar *et al.* 2006 ; Potts *et al.* 2010 ; Winfree 2010). For decades, scientists observed clear evidence of a general decline in pollinators and describe it as the beginning of a global pollination crisis (Potts *et al.* 2010 ; Knight *et al.* 2005b ; Carvell *et al.* 2011). Major factors causing this decline are habitat loss and fragmentation which are usually considered to threaten biodiversity generally (Drayton & Primack 1996 ; Fahrig 2002 ; Brook *et al.* 2003). Intensification of anthropogenic activities due to the rapid growth of the human population over the last century caused a decrease in natural and semi-natural habitats (Lienert 2004 ; Primack 2010). Typically, these types of habitats comprise a mosaic of different biotopes (Hirsch *et al.* 2003 ; Slamova *et al.* 2013). Changes in habitat structure (i.e. reduced habitat surface, increased isolation and edge effect) might be accompanied by species extinction leading to simplification and homogenization of both plant and animal communities (MacDonald *et al.* 2000 ; Biesmeijer *et al.* 2006 ; Sarneel *et al.* 2011). While habitat loss reduces the surface, habitat fragmentation modifies and reduces connectivity and quality of remaining fragments by increasing isolation and edge effects (Saunders *et al.* 1991). Pollinators might be negatively affected by decrease in plant population surface as it might limit the quantity or quality of floral resources - pollen and/or nectar - they depend on (Potts *et al.* 2010 ; Murren 2002 ; Goulson *et al.* 2006). The abundance of pollinators may decrease and pollinator guilds may change since insect species respond differently to floral resource modifications (Steffan-Dewenter *et al.* 2002 ; Ashworth *et al.* 2004), due to temporal (i.e. yearly and/or seasonally) and spatial variations (Hatfield & LeBuhn 2007 ; Sugiura 2012). Furthermore, insects exploit several biotopes to meet their food and nesting site requirements (Russell *et al.* 2005 ; Artz & Waddington 2006). Especially, solitary bees and bumble bees might depend on woody biotopes for nesting and open biotopes for resources (Diaz-Forero *et al.* 2011 ; Söderström *et al.* 2001 ; Westrich 1996). Recent studies revealed a positive influence of forest edges on insect species diversity and abundance while extended

2.2. Introduction

forested areas had negative effects by increasing population isolation (Slamova *et al.* 2013 ; Farwig *et al.* 2009 ; Schüepp *et al.* 2011 ; Ewers *et al.* 2012).

A decrease in pollinator abundance and diversity could entail the disruption of pollination services (Groppe *et al.* 2001 ; Leimu *et al.* 2006 ; Schleuning *et al.* 2009). Plant species that require pollinators to transfer pollen could suffer from reduced visits of pollinators resulting in pollen limitation (Potts *et al.* 2010 ; Goulson *et al.* 2006 ; Goverde *et al.* 2002). As a consequence, individual plants produce fewer fruits and/or seeds than they would with adequate pollen transfer (Burd 1994 ; Steffan-Dewenter & Tscharntke 1999 ; Aizen & Harder 2007). Scarcity of mates for cross-pollination resulting from reduced abundance of flowering individuals might further increase pollen limitation (Knight 2003 ; Shao *et al.* 2008 ; Klank *et al.* 2010). Moreover, pollinators are usually attracted by large floral displays (e.g. high flower density), and patches of low flower density risk to receive less pollinator visits (Grindeland *et al.* 2005 ; Elliott & Irwin 2009).

Wet meadows and peat bogs represent particularly threatened habitats (Westrich 1996 ; Morón *et al.* 2008). Nowadays, they occur as fragments in a mosaic of biotopes where most local plant populations are small and isolated (Gibbs 2000). These usually represent valuable habitats for insects as they display a mosaic of biotopes from woody areas to water bodies (Westrich 1996). Most studies investigating habitat loss and fragmentation in Europe focus on plant and insect species occurring in agricultural landscapes or forests while species-rich wetlands are neglected (Westrich 1996, Morón *et al.* 2008). Considering the accelerating general decline of pollinators, there is a strong need to understand the role of multilevel spatial structure (i.e. within population, population and landscape levels) in affecting pollinator communities in order to create efficient management and conservation strategies for pollinators and their plant partners in wetlands.

During three years, we studied abundance and visitation rates of insect visitors of *Comarum palustre* and plant reproductive success. *Comarum palustre* directly depends on insect pollination to set seed because protandry makes spontaneous selfing improbable (Somme *et al.* 2013). The flowers are visited by a large array of insects, in particular Hymenoptera - mainly *Bombus* and *Andrena* species - Diptera and Lepidoptera (Olesen & Warncke 1992 ; Guillén *et al.* 2005). Bumble bees are considered to be especially efficient pollinators (Mayer *et al.* 2012b). The species occurs in pioneer stages of peat bogs, fens, wet meadows and at the edges of water bodies. Such biotopes suffer from severe destruction and fragmentation due to land use modification (Sarneel *et al.* 2011 ; Strijker 2005) and have been tremendously destroyed in Belgium since the middle of the 19th century (Malbrouck & De Sloover 1989 ; Frankard *et al.* 1998 ; Verté 2007). As fragments of wetlands usually occur in a matrix of different biotopes, we specifically investigated if visitor abundance and visitation rates would be affected by changes

1. in flower density within populations,
2. in population surface and closure (i.e. proportion of the population edge that is constituted by woody areas) at the population level and
3. in population isolation (i.e. percentage of woody area cover in a 500 *m* radius of the population) at the landscape level.
4. If so, would such changes in insect abundance and visitation rates lead to pollen limitation and impact on seed set ? For this purpose, we performed supplemental hand cross-pollination and compared the resulting seed set to the seed set resulting from open pollination.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Ethics statement

The « Département de la Nature et des Forêts » (DNF, Région Wallonne, Belgium) allowed us to sample plant and insect individuals in nature reserves, and the DNF and Natagora granted access to their properties.

2.3.2 Plant species

Comarum palustre (Rosaceae) is a self-compatible, perennial and herbaceous plant flowering from May to July (Olesen & Warncke 1992 ; Macek & Lepš 2007). The species also vegetatively propagates by means of long lignifying rhizomes (Macek & Lepš 2007). An inflorescence consists of a sympodial cyme with seven purple flowers on average. These bowl-shaped flowers last for about five days, where the female phase follows the male phase two days after anthesis (Olesen & Warncke 1992). The centre of the hypanthium is formed by a spongy receptacle that carries large numbers of single-ovuled carpels (227 ± 11 , $n = 113$; C. Mayer personal observations). A flower has about $20.0 (\pm 0.2)$ anthers each producing over 19 303 pollen grains (range 13 761-23 453) (Olesen & Warncke 1992). Copious nectar is secreted between the base of the receptacle and the stamens. The daily production averages $9.5 \mu\text{l} (\pm 5.8 \mu\text{l})$ per flower with a mean sugar concentration of 31.5 % ($\pm 9.3\%$) ($52.0 \pm 1.5\%$ fructose, $47.2 \pm 1.7\%$ glucose, $0.9 \pm 0.3\%$ sucrose, $n = 7$; Somme et al., unpubl.data).

2.3.3 Population spatial characteristics

We studied pollinators and pollen limitation in 14 populations of *Comarum palustre* in South Belgium (Figure 2.4 ; Figure 2.5). These populations were 1.0 up to

2.3. Materials and methods

60.8 *km* apart and located at altitudes between 342 and 611 *m* above sea level. Total monthly rainfall and mean monthly temperature greatly varied from March to July in 2010-2012 (Figure 2.1 ; Royal Meteorological Institute of Belgium, Brussels, Belgium). The study regions were characterized by semi-natural grasslands, fens and bogs intermingled with forested and urbanized areas. Populations were mapped with the help of a GPS (Garmin GPS 60TM). We defined a population as all flowering individuals of *C. palustre* occurring in a wetland fragment. We refer to « population surface » as the area covered by individuals of *C. palustre* within the wetland fragment (Table 2.1). As woody areas (e.g. shrubs, deciduous and mixed forests, and spruce *Picea abies* plantations) might influence landscape connectivity as potential barriers for pollinators (Kreyer *et al.* 2004 ; Öckinger *et al.* 2012), we defined « population isolation » as the percentage of woody area cover in a 500 *m* radius of the population using GE-PATH v 1.4.6 (Cocoa Research Center, Bahia, Brasil). We preferred an area-based isolation metrics to a distance-based metrics since such approaches allow to incorporate landscape characteristics between fragments (Moilanen & Nieminen 2002 ; Kindlmann & Burel 2008). « Population closure » was calculated as the proportion of the population edge that is constituted of woody areas. Flower density refers to the mean number of open flowers recorded on 1 *m*² plots (*n* = 15 plots at random per population).

2.3.4 Insect observations

From 2010 to 2012, all open flowers within 15 randomly chosen 1 *m*² plots per population each year (established for flower density estimates), were observed for 10 *min* periods. We spread these insect observation periods over two sunny and warm days per population during the peak flowering in June, which lasted about two weeks. Observations were conducted for three years in seven core populations (Joubiéval, Regné, Odrimont, Stockem, Vance, Pisserotte and Chantemelle), for two years in four populations (Fosse, Bra, Bihain, La Gotale) and one flowering season in three populations (Grendel, Heinsch and Sainte-Marie ; Table 2.1). The total observation time was 72.1 *h*. The minimum distance between two plots was about 3 *m* on one observation day and care was taken to spread the plots over the entire population. Insects were considered pollinators if they touched floral sexual organs. We identified pollinators in the field or captured them for further identification. Due to their high morphological similarity, individuals of *Bombus terrestris*, *B. lucorum*, *B. cryptarum* and *B. magnus* were pooled into one operational taxonomic unit (OTU), *B. terrestris* *s.l.* We calculated flower visitation rate per 10 *min* as the ratio between the number of flowers visited and the number of open flowers per 1 *m*² plot. We performed the analyses of abundance (i.e. number of individuals) and visitation rate for three distinct groups (i) bumble bees, (ii) solitary bees and (iii) other insects (i.e. other Hymenoptera, Coleoptera, Diptera, Heteroptera, Lepidoptera and Mecoptera).

Since honey bees (2.1% of the visitors during observations) depended more on the activity of local bee-keepers than on habitat spatial structure, we excluded them from analyses.

2.3.5 Pollen limitation and reproductive success

Pollen limitation experiments took place in the same populations as insect observations from 2010 to 2012. For pollination treatments, we selected 10 plots of $1m^2$ per population. Each plot contained at least two inflorescences with the first flower of the cyme at female stage. By doing so, we avoided differences in seed set due to flower position within the inflorescence and resource allocation (Olesen & Warncke 1992 ; Wesselingh 2007). To test for pollen limitation, we performed supplemental hand cross-pollination with conspecific pollen from male-phase flowers situated at least 8 m away from the recipient, as preliminary results on genetic structure of *C. palustre* showed a genet size up to 7 m (Somme *et al.* 2012). Pollen was carefully applied once by brushing the open anthers onto the recipient stigmas. The first flower of the cyme of another inflorescence at the same stage was marked and left for open pollination within each plot.

Fruiting flowers were harvested three weeks later and stored in envelopes at room temperature before achenes were counted. Achenes were scanned at 600 dpi and counted using a macro created with ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). They were automatically sorted into three categories according to size and shape at the same time : plump achenes, partly unfilled achenes and unfertilized ovules. This morphological screening was confirmed by testing the achenes for viability (Kearns & Inouye 1993). They were longitudinally cut and soaked in a 1% 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride solution for 24h at 35°C. The colorimetric test showed that 90% of the plump achenes were viable and 97% of the unfilled achenes were aborted. Results on seed set were adapted accordingly.

2.3.6 Statistical analyses

No intercorrelations were detected between the different spatial characteristics (Spearman Rank Correlation, $r_s = -0.18 - 0.28$, $P > 0.05$), except between population isolation and closure (Spearman Rank Correlation, $r_s = 0.52$, $P < 0.05$). Since woody areas might influence insect abundance and consequently plant pollination in different ways, we assessed forest effects at both the landscape (i.e. population isolation) and population (i.e. population closure) levels. We defined spatial characteristics as influencing factors (fixed effects) and related the response variables (i.e. insect abundances and visitation rates and seed set following open and supplemental pollination) to them with generalised linear mixed models (GLMM). We

2.3. Materials and methods

pooled our observations across all populations and years, resulting in statistically non-independent data points that had to be analysed carefully to avoid the criticism of artificially inflating the degrees of freedom (i.e. pseudoreplication) (van de Pol & Wright 2009 ; Mayer *et al.* 2012a). « Pseudoreplication » is defined as the misanalysis or misinterpretation of replicates that are not statistically independent such as the repeated observation of the same subjects, e.g. populations in our case (Hurlbert 1984). GLMMs however, correctly analyse such hierarchically structured and unbalanced data sets as ours (van de Pol & Wright 2009 ; Zuur *et al.* 2009) and we included the different observation years and the populations as random factors in the models, where year was nested within population (Bolker *et al.* 2009). For GLMMs with count data, we used a negative binomial error distribution, with a log link function and Laplace likelihood approximation, which effectively reduced overdispersion in the variance of the data. For proportional data, best model adaptation was achieved by using a beta distribution with a logit function and residual penalized likelihood approximation (Ferrari & Cribari-Neto 2004). Goodness of fit for population surface was further improved when values were log transformed. The significance of each of the fixed effects specified in the model was tested with a « Type III Tests of Fixed Effects ».

To assess the effects of year and population on the abundance and visitation rate of bumble bees, solitary bees and other insects, we performed a 2-way ANOVA with the observations from the seven populations that were followed in all three years (Table 2.1). To further assess the effects of year, population and pollination treatment on seed set (arcsin transformed), we performed a 3-way ANOVA with the data collected in the same seven populations. To assess any concomitant effect of within-population flower density and population surface on the abundance and visitation rate of bumble bees, solitary bees and other insects, we performed a 2-way ANOVA with the observations from all populations. Populations were considered large when their surface was higher than 1400 m^2 (median surface) and dense when within-population flower density was higher than 24 flowers per square meter (median within-population flower density). We therefore allocated the populations to two surface and density classes : large versus small and dense versus sparse, respectively. If not indicated otherwise, data are presented as mean $\pm$ standard error. GLMMs were estimated with SAS 9.2 (« Proc GLIMMIX » ; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) ; other analyses were computed with R 2.13.0 (R Development Core Team 2012).

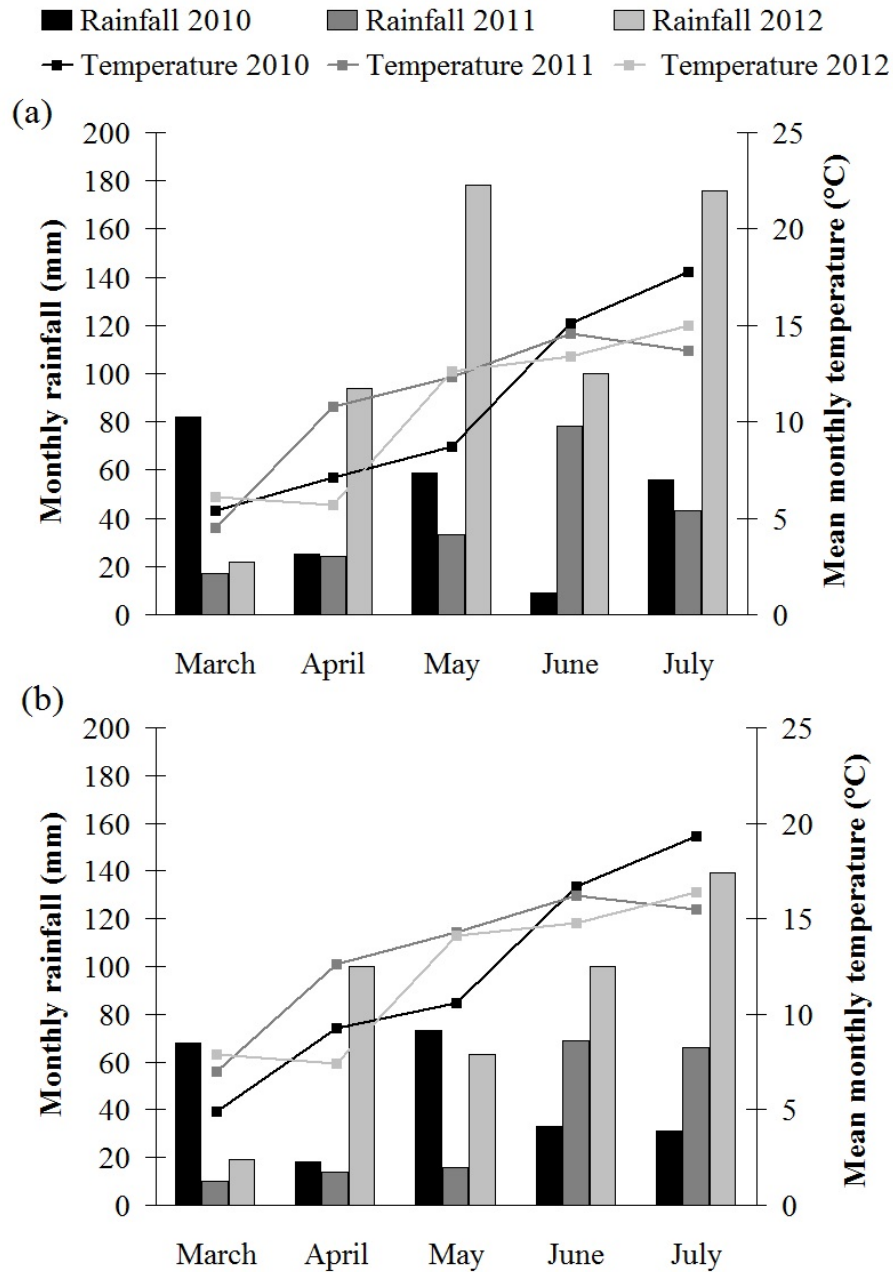


FIGURE 2.1: Monthly rainfall and mean monthly temperature from March to July for the three years of insect observations at (a) the plateau des Tailles and in (b) Haute Semois (sources : Royal Meteorological Institute of Belgium, Brussels, Belgium).

TABLE 2.1: Characteristics of the 14 Belgian study populations of *Comarum palustre* : geographic coordinates, population surface (i.e. area covered by individuals of *C. palustre*), population isolation (i.e. percentage of woody area cover in a 500 m radius of the population), population closure (i.e. proportion of the population edge that is constituted of woody areas), flower density (i.e. mean number of open flowers recorded on 1 m² plots $\pm$ SE; $n = 15$ per population), number of 10 min insect observation periods performed per population (N_{obs}), abundance (i.e. total number of individuals) and visitation rate (i.e. ratio between the number of visited flowers and open flowers within 1 m² plot) per 10 min insect observation periods of bumble bees, solitary bees and other insects. Populations are ordered according to increasing population closure.

Population	Coordinate		Population surface (m ²)	Population isolation (%)	Population closure (%)	Flower density (flowers/m ²)	N_{obs}	Bumble bees		Solitary bees		Other insects	
								Number of individuals	Visitation rate	Number of individuals	Visitation rate	Number of individuals	Visitation rate
Joubiéval (Jo)	50°15'37.69"	5°50'20.78"	2261	25.4	13.6	22 $\pm$ 3	30	31	0.13	3	0.01	61	0.12
Grendel (Gr)	49°45'14.56"	5°48'59.14"	1623	14.1	22.9	17 $\pm$ 3	14	9	0.15	1	0.01	56	0.35
Fosse (Fo)	50°15'45.77"	5°38'37.44"	327	23.0	23.2	41 $\pm$ 7	24	80	0.32	2	0.06	14	0.02
Heinsch (He)	49°41'43.01"	5°43'46.71"	1529	30.2	34.3	25 $\pm$ 3	16	1	0.002	8	0.02	137	0.40
Bra (Br)	50°19'5.51"	5°44'35.54"	468	29.3	36.1	45 $\pm$ 9	21	82	0.28	1	0.01	34	0.05
Regné (Re)	50°14'32.57"	5°46'51.49"	58 860	20.7	43.7	14 $\pm$ 2	40	20	0.09	3	0.01	45	0.07
Odrimont (Od)	50°18'18.00"	5°48'59.86"	5195	15.9	44.1	19 $\pm$ 3	34	12	0.05	1	0.003	32	0.05
Stockem (St)	49°40'30.62"	5°46'14.19"	1241	58.7	45.3	18 $\pm$ 3	41	71	0.29	6	0.07	111	0.22
Bihain (Bi)	50°14'25.89"	5°48'22.60"	945	8.4	51.1	14 $\pm$ 2	25	31	0.18	6	0.05	10	0.04
Vance (Va)	49°40'17.91"	5°40'47.51"	7450	28.0	52.5	23 $\pm$ 4	44	80	0.33	22	0.11	195	0.20
Pisserotte (Pi)	50°13'8.32"	5°47'3.74"	184	58.7	60.5	20 $\pm$ 4	38	77	0.35	5	0.03	47	0.08
La Gofale (LG)	50°19'48.02"	5°41'18.84"	154	43.5	62.1	6 $\pm$ 1	14	5	0.05	3	0.15	11	0.10
Sainte-Marie (SM)	49°40'3.31"	5°32'56.81"	253	67.1	88.2	16 $\pm$ 3	15	60	0.71	45	0.26	63	0.32
Chantemelle (Ch)	49°39'33.51"	5°39'54.89"	6422	73.7	89.8	23 $\pm$ 4	44	115	0.40	27	0.05	106	0.20

2.4 Results

2.4.1 Insect observations

A total of 1 771 insects from 63 different species were recorded visiting flowers of *C. palustre* (Appendix 1). The main visitors were Hymenoptera (49.1%), Diptera (35.7%) and Lepidoptera (9.2%). Other insect orders (Coleoptera, Mecoptera, Heteroptera, Hemiptera and Orthoptera) were recorded in negligible quantities (Appendix 1). Bees were the most abundant Hymenoptera with 10 species representing 41.2% of all visitors. Bumble bees, with 9 different species, summed up to 96.1% of the bee visitors (Table 2.1). The observed bumble bee species were *Bombus lapidarius* (10.7%), *B. terrestris s.l.* (9.8%), *B. pascuorum* (5.9%), *B. pratorum* (3.8%), *B. campestris* (2.4%), *B. vestalis* (2.3%), *B. hypnorum* (1.8%), *B. hypnorum* (1.2%) and *B. veteranus* (0.1%). Syrphidae (Diptera) were the second most abundant visitors accounting for 26.1% of all visitors. The total number of visitors per 10 *min* observation periods varied significantly among years and populations, with less insects observed in 2012 (1.1 ± 0.1) than in 2010 (3.9 ± 0.2) and 2011 (6.0 ± 0.3 ; Table 2.2).

The mean number of bumble bees, solitary bees and other insects per population differed significantly among years and populations (Table 2.2). Significantly more bumble bees and solitary bees were observed per observation period in 2011 (3.3 ± 0.1 and 0.5 ± 0.1 , respectively) than in 2010 (0.5 ± 0.1 and 0.2 ± 0.1 , respectively) and 2012 (0.2 ± 0.1 and 0.1 ± 0.1 , respectively; Table 2.2).

Within-population plot flower density positively affected abundances of bumble bees and other insects, but not of solitary bees (Table 2.3). We did not find any significant effect of the within-population plot flower density and population surface together, on insect abundance (2-way ANOVA, $F = 1.84 - 4.35$, $P > 0.05$). Population closure positively influenced bumble bee and solitary bee abundance since populations of *C. palustre* showing high proportions of forest edges contained high abundances of bumble bees and solitary bees. Isolated populations of *C. palustre*, i.e. located in landscapes with high proportions of woody areas, contained high abundances of bumble bees and solitary bees, as well. Population surface, closure and isolation had no significant influence on the number of other insects (Table 2.3).

No significant influence of within-population plot flower density or within-population plot flower density together with population surface (2-way ANOVA, $F = 0.56 - 2.30$, $P > 0.05$) on insect visitation rates was detected (Table 2.3). Population closure and isolation positively influenced solitary bee visitation rates, whereas only population isolation positively influenced bumble bee visitation rates (Table 2.3). Insect visitation rates were significantly different among years and populations (Table 2.2). In particular, bumble bee and solitary bee visitation rates were significantly higher in 2011 (0.52 ± 0.02 ; 0.05 ± 0.01) than in 2010 (0.08 ± 0.01 ; 0.02 ± 0.01) and

2.4. Results

TABLE 2.2: Effects of year, population and combination of the two on the total insect and bumble bee abundance and the bumble bee, solitary bee and other insect visitation rate in the 7 populations studied from 2010 to 2012 (results of 2-way ANOVA; d.f. = degrees of freedom; SS = sum of squares; F = F-values; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; n.s. = non significant.)

	d.f.	SS	F
Total insect abundance per plot			
Year	2	1203.08	83.49***
Population	6	806.25	22.38***
Population x Year	12	634.31	8.80***
Bumble bee abundance per plot			
Year	2	528.83	86.67***
Population	6	161.19	10.57***
Population x Year	12	120.04	3.94***
Bumble bee visitation rate per plot			
Year	2	16.65	95.77***
Population	6	4.71	10.83***
Population x Year	12	4.05	4.66***
Solitary bee abundance per plot			
Year	2	13.90	13.42***
Population	6	11.12	4.29***
Population x Year	12	15.47	2.99***
Solitary bee visitation rate per plot			
Year	2	0.16	8.12***
Population	6	0.14	2.87 n.s.
Population x Year	12	0.17	1.71 n.s.
Other insect abundance per plot			
Year	2	142.61	19.28***
Population	6	244.11	13.20***
Population x Year	12	241.58	6.53***
Other insect visitation rate per plot			
Year	2	0.90	13.90***
Population	6	1.31	8.07***
Population x Year	12	1.76	5.42***

2012 (0.04 ± 0.01 ; 0.02 ± 0.01).

2.4.2 Reproductive success and pollen limitation

On average, fruiting flowers of *Comarum palustre* contained 153 ± 4 achenes, which corresponded to a mean natural seed set of $55.2 \pm 1.7\%$. Overall, seed set significantly differed between year, population and pollination treatment (Table 2.4; Figure 2.2). Seed set was significantly lower in 2012 ($38.4 \pm 9.1\%$) than in 2010 ($60.4 \pm 8.8\%$) and 2011 ($69.9 \pm 6.9\%$). Seed set differed significantly between treatments, with a lower seed set following open pollination than following supplemental pollination ($55.2 \pm 1.7\%$ and $62.0 \pm 1.4\%$, respectively). However, no pollen limitation was detected in 2010 and 2011, except for the population of Regné in 2010. In 2012, the populations of Bra and Stockem also showed pollen limitation (Figure 2.2)

CHAPITRE 2. Multilevel spatial structure impacts on the pollination services of *Comarum palustre* (Rosaceae)

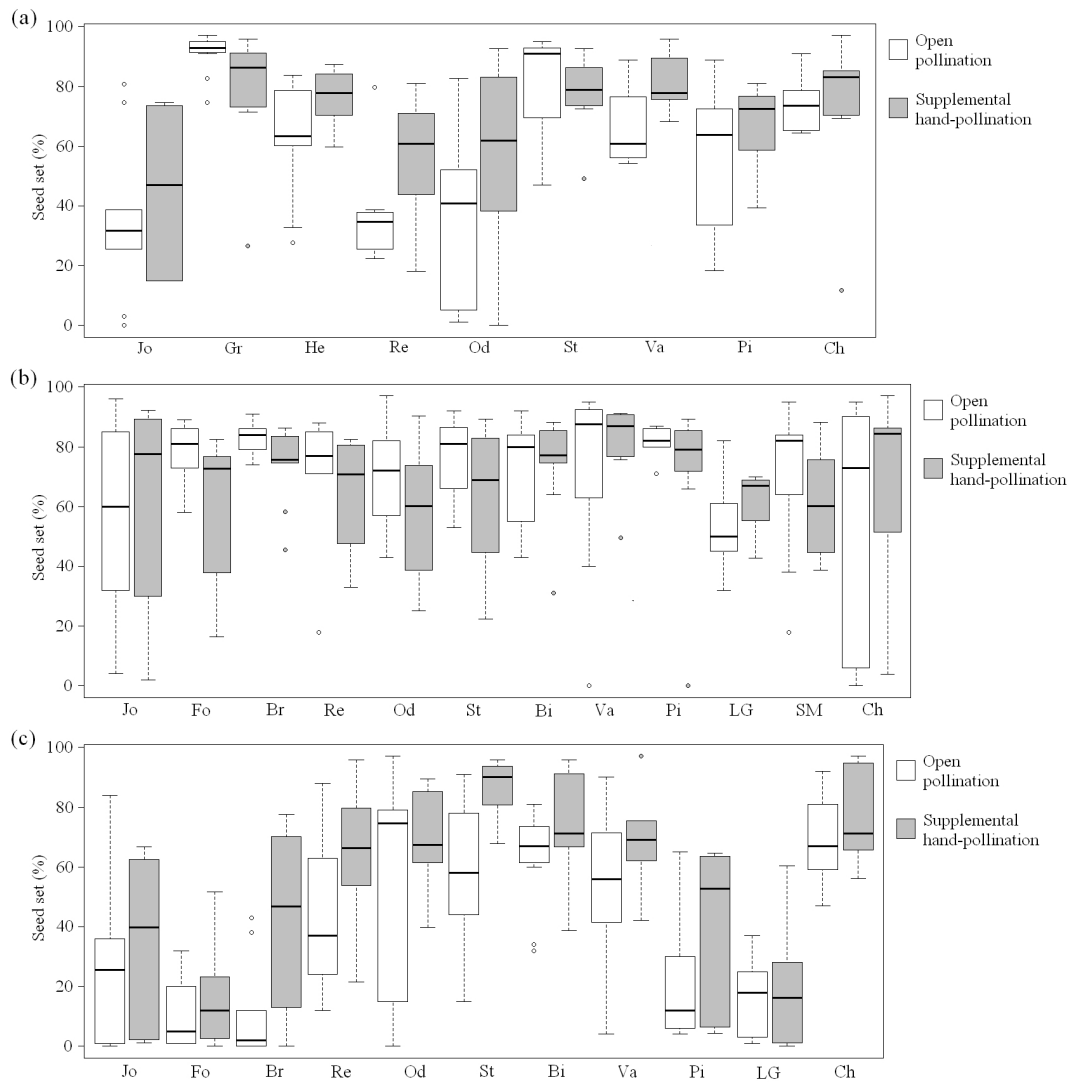


FIGURE 2.2: Seed set per fruiting flower following open pollination and supplemental hand cross-pollination for the 14 Belgian study populations of *Comarum palustre* in (a) 2010, (b) 2011 and (c) 2012. Populations are ordered according to increasing population closure.

Within-population plot flower density had no effect on seed set following open and supplemental pollinations (Table 2.5). Also, we did not find any effect of population surface, closure and isolation on seed set (Table 2.5). Nevertheless, open pollinated flowers from populations with high abundance and visitation rate of bumble bees showed an increased seed set (Table 2.5 ; Figure 2.3).

2.4. Results

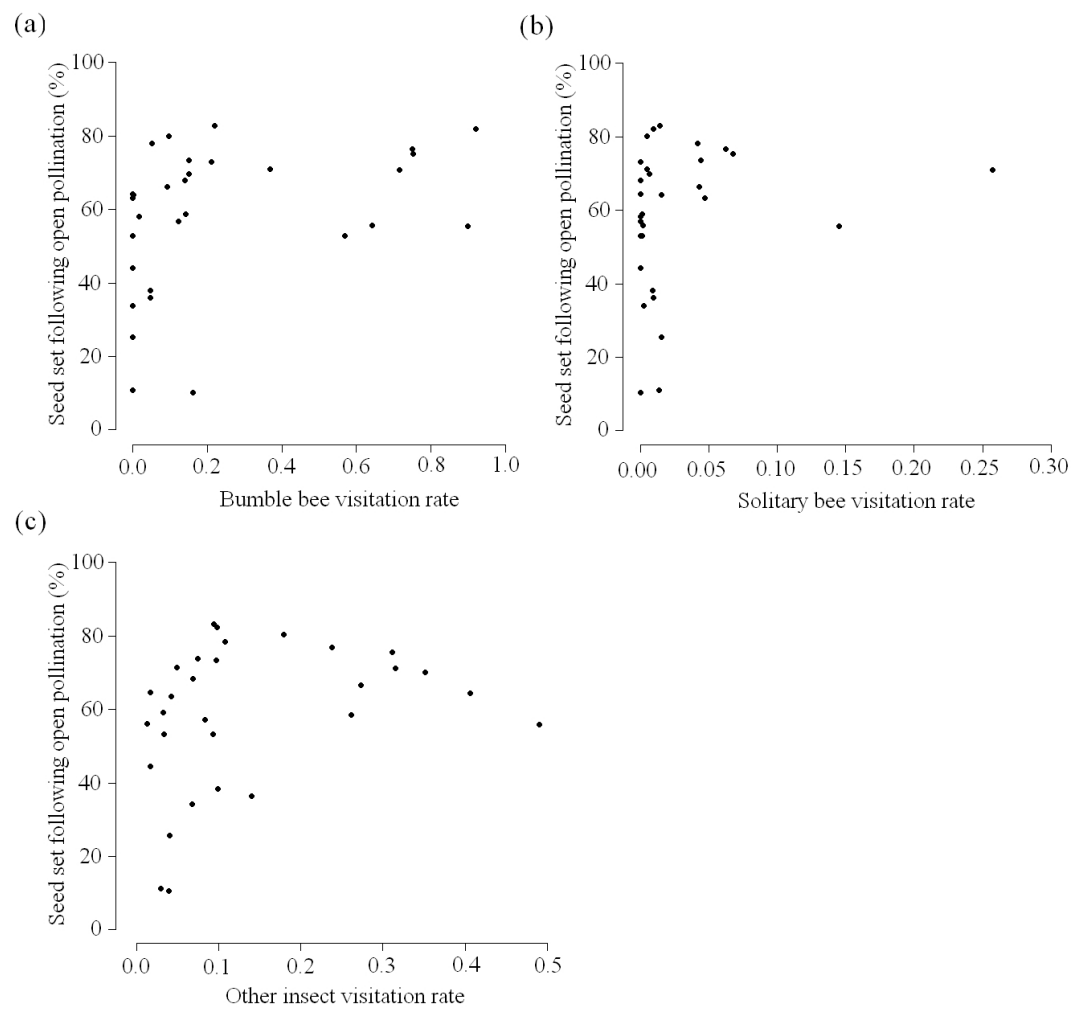


FIGURE 2.3: Relationship between the visitation rate of (a) bumble bees, (b) solitary bees and (c) other insects, and the seed set following open pollination.

TABLE 2.3: Influence of within-population plot flower density and population surface, isolation and closure on the number of individuals (i.e. abundance) and visitation rate of bumble bees, solitary bees and other insects for the fourteen populations of *Comarum palustre*. (results of GLMMs ; *d.f.* = degrees of freedom ; *F* = *F*-values ; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; *n.s.* = non significant.)

	Bumble bees		Solitary bees		Other insects							
	Number of individuals	Visitation rate	Number of individuals	Visitation rate	Number of individuals	Visitation rate						
Flower density	1, 399	16.67***	1, 399	0.05 <i>n.s.</i>	1, 399	0.27 <i>n.s.</i>	1, 399	0.83 <i>n.s.</i>	1, 399	6.53*	1, 399	3.29 <i>n.s.</i>
Population surface	1, 399	0.21 <i>n.s.</i>	1, 399	0.20 <i>n.s.</i>	1, 399	0.14 <i>n.s.</i>	1, 399	0.30 <i>n.s.</i>	1, 399	0.31 <i>n.s.</i>	1, 399	0.18 <i>n.s.</i>
Population isolation	1, 399	2.13 <i>n.s.</i>	1, 399	5.59*	1, 399	5.15*	1, 399	5.91*	1, 399	1.57 <i>n.s.</i>	1, 399	1.31 <i>n.s.</i>
Population closure	1, 399	39.11***	1, 399	1.76 <i>n.s.</i>	1, 399	11.45***	1, 399	10.35**	1, 399	0.11 <i>n.s.</i>	1, 399	0.26 <i>n.s.</i>

2.4. Results

TABLE 2.4: Effect of year, population, pollination treatment (i.e. open and supplemental pollination) and their combinations on the seed set per fruiting flower in the 7 populations studied from 2010 to 2012 (results of 3-way ANOVA; d.f. = degrees of freedom; SS = sum of squares; F = F-values; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; n.s. = non significant.)

	d.f.	SS	F
Seed set per fruit			
Year	2	3.43	18.50***
Population	6	5.97	10.75***
Treatment	1	0.79	8.49**
Population x Treatment	6	0.14	0.25 n.s.
Population x Year	12	3.90	3.51***
Treatment x Year	2	0.43	2.33 n.s.
Population x Treatment x Year	12	1.19	1.07 n.s.

TABLE 2.5: Effect of insect variables (mean number and visitation rate of bumble bees, solitary bees and other insects), within-population plot flower density and population surface, isolation and closure on seed set following open and supplemental pollination for the 14 populations of *Comarum palustre*. (results of GLMMs; d.f. = degrees of freedom; F = F-values; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; n.s. = non significant.)

	Open pollination		Supplemental pollination	
	d.f.	F	d.f.	F
Number of bumble bees	1, 13	5.74*	1, 13	3.16 n.s.
Number of solitary bees	1, 13	0.05 n.s.	1, 13	0.01 n.s.
Number of other insects	1, 13	1.26 n.s.	1, 13	2.14 n.s.
Bumble bee visitation rate	1, 13	4.74*	1, 13	0.85 n.s.
Solitary bee visitation rate	1, 13	11.25 ***	1, 13	0.10 n.s.
Other insect visitation rate	1, 13	1.24 n.s.	1, 13	3.53 n.s.
Flower density	1, 279	2.66 n.s.	1, 279	0.41 n.s.
Population surface	1, 279	4.00*	1, 279	2.23 n.s.
Population isolation	1, 279	0.43 n.s.	1, 279	0.22 n.s.
Population closure	1, 279	1.66 n.s.	1, 279	0.98 n.s.

2.5 Discussion

2.5.1 Effect of spatial structure on pollinator abundance and visitation rate

We observed that the open, bowl-shaped flowers, easily accessible for pollen and nectar resources, attracted a large variety of insects with 63 different species belonging to eight orders. Our results indicate that *Comarum palustre* can be considered as a generalist species (Larson & Barrett 2000), which confirms a former study performed in natural populations in Denmark (Olesen & Warncke 1992). Among the observed species, the most abundant pollinators of *C. palustre* were bumble bees and solitary bees, which confirms previous studies (Olesen & Warncke 1992 ; Mayer *et al.* 2012b).

We found that more insects, except solitary bees, foraged in high flower density plots within populations. Higher bumble bee abundance in high flower density plots confirms the results of a previous study on *C. palustre*, which reported more bumble bees in denser plots than in sparser plots (Mayer *et al.* 2012b). As bumble bees rely exclusively on pollen and nectar for feeding and larva rearing (Michener 2007), floral resources availability in high flower density plots might be high, at low travelling costs, which might positively affect their abundance (Mayer *et al.* 2012a ; Pyke 1980 ; Fontaine *et al.* 2008). This result is consistent with the observation that flower density is among the key determinants of pollinator abundance within plant populations (Dauber *et al.* 2010 ; González-Varo *et al.* 2009).

At the population level, population surface did not affect pollinator abundance nor pollinator visitation rate. These results did not confirm a former study, which reported a positive influence of population surface of *C. palustre* on bumble bee abundance (Mayer *et al.* 2012b). This might be related to the fact that more populations have been surveyed over three years than in 2009, where only four populations were surveyed during one flowering season. We consequently assumed that other spatial characteristics (e.g. population isolation and closure) might influence pollinator abundance and visitation rate.

Here, we highlighted the positive effect of population isolation (i.e. the proportion of woody areas) within a 500 *m* radius on the visitation rate of bumble bees, and the abundance and visitation rate of solitary bees. A highest visitation rate for bumble bees in the isolated populations of *C. palustre* might be due to forests, which could represent barriers for bumble bee movements across landscape (Kreyer *et al.* 2004), as these species forage preferentially in open habitats (Svensson *et al.* 2000). Studies in open landscapes reported bumble bee species to forage up to 2.2 *km* from their nesting sites, whereas they usually forage in a radius of 600 *m* from their nest in woody landscapes (Diaz-Forero *et al.* 2011 ; Osborne *et al.* 2008). Our hypothesis

2.5. Discussion

is supported by a study performed in Estonia on 24 bumble bee species in a woody landscape (Diaz-Forero *et al.* 2011), which showed restricted movements of bumble bees. Restricted movements might promote small scale movements between flowering patches, consequently increasing visitation rate and enhancing the chances for flowers to be visited and effectively pollinated (Hirsch *et al.* 2003 ; Artz & Waddington 2006). The abundance and visitation rate of solitary bees in isolated populations of *C. palustre* might be more related to their small scale movements, as they usually fly up to 300 m from their nests (Westrich 1996 ; Gathmann & Tscharncke 2002), than to population isolation. High isolation of *C. palustre* populations might result in insects foraging both on the target species and on other plant species occurring in the surrounding community (Kwak & Jennersten 1991). Comparing the attractivity and the quality of rewards (i.e. pollen and nectar) of this species with other plant community species might need further consideration. We might then estimate if these populations of *C. palustre* were rewarding and attracting enough in order to supply insect food requirements.

We further found a positive effect of population closure on bumble bee and solitary bee abundance. First, forest edges might provide suitable nesting sites in the study wetlands, especially for bumble bees (Söderström *et al.* 2001 ; Goulson *et al.* 2010) and solitary bees (Gathmann & Tscharncke 2002 ; Cane 2001). Furthermore, forest edges may buffer microclimatic conditions (temperature, wind and humidity) and could thus offer suitable foraging zones to insects during hot periods (Söderström *et al.* 2001 ; Kindvall 1995). High proportion of forest edges due to higher abundance of small woody patches would then allow for more interactions between nesting sites at the forest edge and foraging zones located in wet open flowering areas. This hypothesis is supported by a study on the pollination services of *Asclepias lanceolata*, which reported higher pollinator abundance in the vicinity of woody areas (Artz & Waddington 2006). Species of the Coleoptera, Diptera, Lepidoptera and Mecoptera observed in our study are usually considered to be more dependent on host plant species than nesting opportunities (Artz & Waddington 2006 ; Körösi *et al.* 2012). Our results might further support the importance of biotope mosaic (Pickett & Cadenasso 1995).

Yearly variation in bumble bee abundance, with about 13 times more bumble bee individuals observed in 2011 than in 2012, might have been influenced by climatic conditions. Bumble bee and solitary bee species vary in their emerging times after winter between February and May (Goulson *et al.* 2008a ; Pyke *et al.* 2011). Sudden variation in temperature might be disastrous for queens of bumble bees and solitary bees at the time of nesting settlements (Pouvreau 2004 ; Goulson 2009 ; Bartomeus *et al.* 2011). Changes in temperature coupled with high precipitation (four times higher in 2012 than in 2011), which might have flooded underground nests of bees, might explain the low pollinator abundance observed in 2012 (Pouvreau 2004 ; Rasmont & Iserbyt 2012 ; Torres-Díaz *et al.* 2007).

2.5.2 Reproductive success and pollen limitation

Our study reported pollen limitation as unmanipulated flowers (i.e. left for open pollination) showed a lower seed set than flowers saturated with pollen (i.e. with supplemental hand cross-pollination). This result did not confirm those reported in a former study performed in one population of *C. palustre* in Denmark (Olesen & Warncke 1992). As a generalist and self-compatible species, *C. palustre* was expected to be less vulnerable to pollen limitation (Knight *et al.* 2005b ; Ashman *et al.* 2004). However its protandrous flowers prevent the species from spontaneous selfing, which makes *C. palustre* dependent on animals for effective pollination (Somme *et al.* 2013). Our results suggested that the abundance of bumble bees and visitation rate of solitary bees and bumble bees positively influenced reproductive success of unmanipulated flowers. High visitation rate of pollinators usually increases the chances of conspecific pollen deposition on stigmas, mainly through geitonopollination events in self-compatible species (Somme *et al.* 2013 ; Albert *et al.* 2008 ; Eckert 2000). In particular, bumble bees and solitary bees preferentially forage among near-neighbour flowers, leading to short pollen movements (Fontaine *et al.* 2008). A decrease or the loss of these pollinators might then cause pollen limitation, decreasing the likelihood of successful pollination through compatible pollen deposition, ultimately decreasing plant reproductive success and long-term survival of the plant population.

Besides, variation in reproductive success might also result from conspecific competition in high flower density plots as the chances of a single flower to be visited therein might be reduced (Makino *et al.* 2007 ; Johnson *et al.* 2012). The abundance of *Rhopalus maculatus* (Heteroptera), which feed on *C. palustre* by eating achenes (Schaefer & Chopra 1982), could further influence plant reproductive success, as well. The predation impact of the insect on individual reproductive success of *C. palustre* might need further investigations. Also, weather and microclimatic conditions during fruiting flower maturation and local environmental variations such as soil richness and water availability might need to be further investigated as they may influence seed production (Agren *et al.* 2008). Furthermore, inherent plant physiology might influence seed production, especially in clonal plant species such as *C. palustre*. The way resource allocation influences plant reproduction in clonal plants and physiological integration between daughter and mother ramets are not well known (Rautiainen *et al.* 2004 ; Louâpre *et al.* 2012). Further investigation in resource allocation within the clones of *C. palustre* are relevant as clonality might lead to erroneous results in pollen limitation studies (Knight *et al.* 2005b ; Wesselingh 2007).

2.6 Conclusion

Our findings indicate that flower density within populations, woody areas and related forest edges were determining factors for insect abundance in the studied populations of *C. palustre*. Variations in visitation rates of bumble bees and solitary bees might subsequently influence the reproductive success. In the current context of wetland fragmentation, it is of major interest to favour multilevel spatial structure mixing woody biotopes with open biotopes, subsequently including nesting sites and food resources for insects. A mosaic of biotopes could thus add to the conservation of plant communities and their interactions with pollinators. Further, to assess the impact of habitat fragmentation on plant reproductive success, a multiple approach should be followed : from spatial structure of landscapes to within-characteristics of plant populations. Plant-pollinator interactions and environmental conditions should be considered together.

2.7 Acknowledgments

The authors thank the Belgian Fund for Scientific Research (FNRS contract 2.4540.09) for funding this research. L. Somme holds a FRIA fellowship (Funds for training in Industry and Agriculture Research). We thank the « Département de la Nature et des Forêts » (DNF, Région Wallonne, Belgium) for the derogation concerning the sampling of plant and insect individuals in nature reserves, and the DNF and Natagora for granting access to their properties. We also thank Christel Buyens and Marc Migon for technical assistance, Alain Guillet for statistical analysis advice, Xavier Draye for development of the macro for ImageJ and anonymous referees for improving the manuscript. The study was conducted in accordance with current Belgian laws.



FIGURE 2.4: *Vue in situ des sites d'étude au plateau des Tailles. De gauche à droite, de haut en bas : Bihain, Pisserotte, Odrimont, La Gotale, Joubiéval, Bra, Regné et Fosse. (photographies : L. Somme)*

2.7. Acknowledgments



FIGURE 2.5: *Vue in situ des sites d'étude en Haute Semois. De gauche à droite, de haut en bas : Grendel, Stockem, Heinsch, Vance, Chantemelle et Sainte-Marie. (photographies : L. Somme)*

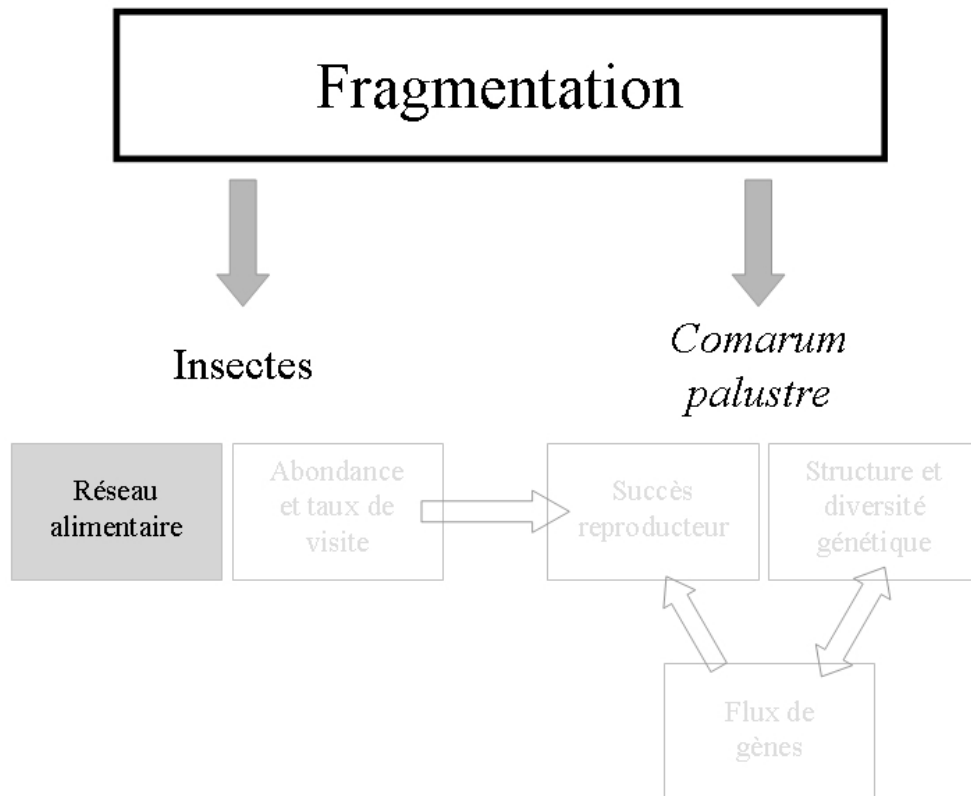


FIGURE 2.6: Le chapitre précédent a montré l'impact des zones boisées et des li-sières qui leur sont associées sur l'abondance et le taux de visite des principaux pollinisateurs de *Comarum palustre*. La qualité et la diversité des ressources flo- rales au sein de leur habitat peut également influencé leur comportement de visite. Le présent chapitre étudie la composition (polypeptides, acides aminés et phytosté- rols) du pollen, et la production et la composition du nectar des principales espèces végétales au sein des milieux tourbeux humides et ayant la même phénologie que *Comarum palustre*. La récolte des pelotes de pollen permettra de déterminer le ré- seau alimentaire et leur fidélité à *Comarum palustre*.

Chapitre 3

Pollen and nectar quality drive major and minor floral choices of bumble bees ¹

3.1 Abstract

Bee visits on flowers depend on pollen and nectar quality offered by plants as bees exclusively rely on these rewards for feeding. Only a few studies analysed coupled data of rewards collection and chemical quality of these rewards. Here the floral choices of four bumble bee species (*Bombus hypnorum*, *B. lapidarius*, *B. pascuorum* and *B. terrestris s.l.*) visiting *Comarum palustre* flowers was assessed in South Belgium through identification of species pollen grains in 58 corbicular pollen loads. To estimate reward nutritive value of the six most visited plant species, we quantified polypeptide, amino acid and phytosterol content of their pollen (*Comarum palustre*, *Valeriana repens*, *Trifolium pratense* and *Cirsium palustre*), as well as nectar production and composition (*Comarum palustre*, *Lychnis flos-cuculi*, *Valeriana repens*, *Persicaria bistorta*, *Trifolium pratense* and *Cirsium palustre*). *Bombus terrestris s.l.* showed a broader diet breadth (12 vs. 6-8 plant species) than the other bumble bee species investigated. The four bumble bee species collected high chemical quality pollen from *Comarum palustre* and *Trifolium pratense* (i.e. high essential amino acid and phytosterol content). Yet, individuals of *B. terrestris s.l.* and *B. hypnorum* enlarged their diet breadth to less valuable pollen resources such as *Valeriana repens* or *Cirsium palustre*. In particular, pollen of *Cirsium palustre* contained high relative proportions of δ^7 -stigmasterol (24.3-30.1%) which is not assimilated by bumble bee

1. Somme, L., Vanderplanck, M., Michez, D., Lombaerde, I., Moerman, R., Wathelet, B., Wattiez, R., Lognay, G. and Jacquemart, A.L

species. *Lychnis flos-cuculi*, *Persicaria bistorta* and *Comarum palustre* represent major nectar sources for bumble bee species as they offer abundant and concentrated nectar. As *Comarum palustre* stands are highly attractive to bumble bees and offered pollen of high quality, they can be considered as important resources for the conservation of the pollinator food web. Though, co-flowering plant species are further requisite nectar and pollen sources.

3.2 Introduction

Most flowering plant species depend on animals to ensure effective pollination (Ollerton *et al.* 2011). They display various features to attract pollinators such as flower colour, shape and odour (Raguso 2004). Flowers also provide nectar and pollen as rewards (Southwick *et al.* 1981 ; Waser 1986). For bees, they represent the unique food sources for both adults and larvae (Michener 2007). Bee-pollinated plant species show nectar and pollen of high quality (i.e. nutritional value) and / or in large amount, though these represent energetic costs (Proctor *et al.* 1996 ; Schlindwein *et al.* 2005 ; but see Roulston *et al.* 2000).

It is commonly accepted that nectar represents the major energetic source for many flower visitors although bees also mix it with pollen for larvae provision (Cnaani *et al.* 2006 ; Waser & Ollerton 2006). Nectar consists largely of sugars (mainly sucrose, glucose and fructose) and water, but it also contains various minor constituents such as amino acids or lipids that may, directly or indirectly, have nutritional significance (Corbet 2003 ; Gonzalez-Teuber & Heil 2009). The energy value of nectar depends on its volume and total sugar concentration (Cnaani *et al.* 2006 ; Nicolson (2011)).

Pollen is one of the prime nutrient resource used for bee larva development (Génissel *et al.* 2002 ; Michener 2007 ; Kitaoka & Nieh 2009). It consists mostly of lipids (including phytosterols), sugars, proteins, amino acids and vitamins (Day *et al.* 1990 ; Roulston & Cane 2000 ; Vanderplanck *et al.* 2011 ; Vanderplanck *et al.* 2013). Bees need to assimilate amino acids from pollen, especially some essential amino acids (e.g. leucine, valine and isoleucine ; De Groot 1953). Although they are considered non-essential amino acids, proline, aspartic and glutamic acids are important as energy and nitrogen sources (Chapman 1998). Phytosterols are further requisite nutrients since they are precursors of molting hormones and bees are not able to synthesize them *de novo* (Behmer & Nes 2003 ; Cohen 2004). All these essential nutrients are highly variable among plant species (e.g. Roulston *et al.* 2000 ; Rasmont *et al.* 2005b ; Vanderplanck *et al.* 2013).

Abundance and quality of rewards greatly influence foraging behaviour of plant visitors, especially for generalist bees like bumble bees. Bumble bees are a popular

3.2. Introduction

and well-examined group of pollinators (Goulson 2009). They have been reported to discriminate between small differences in nectar concentration and prefer sugar concentrations higher than 40% dry weight (Cnaani *et al.* 2006). Studies reported bumble bees to forage preferentially on pollen with high protein content (Robertson *et al.* 1999 ; Hanley *et al.* 2008 ; Leonhardt & Blüthgen 2012), although amino acid composition could better determine the pollen required by bees (Cook *et al.* 2003 ; Nicolson 2011). Moreover, their floral choices can quickly change. Bumble bees have been reported to concentrate on patches of abundantly flowering, resource-rich plant species though they might switch to more rewarding alternative plant species when they become available (Goulson & Darvill 2004 ; Fontaine *et al.* 2008 ; Liao *et al.* 2011). Although bumble bees can visit various plant species for pollen, for nectar or for both during one foraging trip, they can also focus only on one flowering species during a foraging bout (Stout & Goulson 2002 ; Ishii 2005 ; Gruter & Ratnieks 2011), ensuring the higher deposition of conspecific pollen grains on stigmas, and plant reproductive success. Bumble bee constancy on attractive plants might then profit to both partners.

Studies usually focus on bumble bee host plant use and foraging constancy (e.g. Carvell *et al.* 2006b ; Kleijn & Raemakers 2008 ; Connop *et al.* 2010) or on pollen nutritive value of several plant species (e.g. Tasei & Aupinel 2008 ; Hagbery & Nieh 2012). However, bumble bee host plant choices coupled with nectar and pollen quality of host plant have been rarely addressed (Hanley *et al.* 2008 ; Leonhardt & Blüthgen 2012). Moreover to our knowledge, there is no study presenting comprehensive comparative chemical analyses (i.e. polypeptides, amino acids and sterols) of floral rewards of the main plant resources. In the context of bumble bee decline mainly due to floral resources shift (Goulson *et al.* 2008a ; Carvalheiro *et al.* 2013), assessing bumble bee food web and its nutritional value is essential to propose conservation strategies.

We focused our study on the food web of the main pollinators of *Comarum palustre* (Rosaceae). This plant species occurs in wet meadows and peat bogs, which represent refuges for many rare plant species as these biotopes occur nowadays as fragments in a mosaic of woody and semi-natural biotopes (Frankard *et al.* 1998 ; Gibbs 2000 ; Verté 2007). Among these threatened species, *C. palustre* is particularly dependent on bumble bees to ensure its reproductive success (Mayer *et al.* 2012b ; Chapitre 2). We assessed pollen foraging constancy and floral choices of four bumble bee species (*Bombus lapidarius*, *B. terrestris* s.l., *B. pascuorum* and *B. hypnorum*), which commonly occur in peaty wet meadows in South Belgium (Mayer *et al.* 2012a). We collected pollen loads of bumble bees for accurate and quantitative estimates of their pollen foraging constancy and floral choices. We subsequently analyzed chemical content of nectar and pollen, as well as nectar production of the major host plants of the food web. We specifically aimed to answer the following questions :

1. Are bumble bee species differently constant during pollen collection ?
2. Do quality of nectar and pollen explain their different choices ?

3.3 Methods

3.3.1 Bumble bee pollen loads

3.3.1.1 Pollen loads for constancy estimate

We sampled pollen loads of bumble bees in three sites in South Belgium in 2011 : Bihain (50°14'25.89"N, 5°48'22.60"E), Chantemelle (49°39'54.89"N, 5°39'54.89"E) and Joubiéval (50°15'37.69"N, 5°50'20.78"E). The main flowering plants species in all three populations were *Cirsium palustre*, *Comarum palustre*, *Lychnis flos-cuculi*, *Persicaria bistorta* and *Valeriana repens*. Pollen loads were collected from 58 bumble bee workers visiting *Comarum palustre* [*B. lapidarius* ($n = 12$), *B. terrestris* s.l. ($n = 30$), *B. pascuorum* ($n = 5$) and *Bombus hypnorum* ($n = 11$)]. Due to their high morphological similarity, individuals of *B. terrestris*, *B. lucorum*, *B. cryptarum* and *B. magnus* were pooled into one operational taxonomic unit (OTU), *B. terrestris* s.l. After workers have been immobilized in a marking cage with soft plunger, the two pollen loads were gently removed using a toothpick. Pairs of pollen loads were acetolyzed (Erdtman 1960) and pollen grains identified under light microscopy (Wild-Heerbrugg M3B) at a magnification of 450 x. Pollen identification was based on a reference collection of the Université catholique de Louvain, an identification key (Beug 2004) and a comprehensive list of blooming plants in the study sites. The number of pollen was determined for each plant species and pairs of pollen loads. At least 400 pollen grains for each of the 58 pairs of pollen loads were identified and counted.

3.3.1.2 Pollen loads for chemical analyses

Small flower size or low pollen volume did not allow us to directly sample pollen from inflorescences. We sampled pure pollen loads of four dominant plant species (*Cirsium palustre*, *Comarum palustre*, *Trifolium pratense* and *Valeriana repens*) by placing a colony of *B. terrestris* (Biobest, Westerlo, Belgium) in a flight tent with bunches of flowers of the target species only in June and July 2012. We sampled *Trifolium pratense* as this plant was present at the edge of the study sites and it is highly attractive to bumble bees (Carvell 2002). We were not able to collect a sufficient amount of pure pollen loads of *Lychnis flos-cuculi* and *Persicaria bistorta* to perform further analysis on pollen composition.

3.3.2 Chemical analyses of pollen loads

3.3.2.1 Polypeptide analysis

The polypeptide content was quantified from 5 *mg* dry pollen of each species in triplicate, following the method described in Vanderplanck *et al.* (2013). The pollen was first ground by bead beating under nitrogen. The polypeptide purification protocol combines washes and a phenol/SDS extraction. The procedure can be summarized as follow : (i) three successive wash steps with respectively TCA/acetone, methanolic ammonium acetate and acetone to remove contaminants ; (ii) elimination of acetone to pellet dryness ; (iii) polypeptide extraction with a phenol/SDS mixture ; (iv) polypeptide precipitation from phenol phase with methanolic ammonium acetate ; (v) washes (methanol and acetone) and air-dry polypeptide pellet ; and (vi) resuspension of polypeptide pellet in a 4*M* guanidine.HCl buffer. The quantification of total polypeptide was performed using standard curve of BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific) at the University of Mons (Mons, Belgium).

3.3.2.2 Amino acid analysis

The amino acid content was quantified from 2-3 *mg* dry pollen of each species in triplicate. At each sample, we added 1 *ml* of hydrolysis solution (6*N* HCl, 0.1% phenol and 500 μ *M* norleucine). Norleucine constituted the internal standard allowing further amino acid quantification after determination of each response factor. Only tryptophan was omitted because its isolation requires a separate alkaline hydrolysis from additional amount of sample. Moreover, tryptophan is hardly ever a limiting essential amino acid (Standifer *et al.* 1980). Tubes were put for 1 *min* under nitrogen to avoid methionine degradation, and then incubated for 24 *h* at 110 °C. The hydrolysate was evaporated until dryness under vacuum in a boiling bath at 100 °C. Afterwards, 1 *ml* of buffer pH 2.2 was added into each tube. The sample solution was mixed and poured in a HPLC vial after filtration (0.2 μ *M*). Total amino acids were measured separately with an ion exchange chromatograph (Biochrom 20 plus amino acid analyser) at the University of Liège (Gembloux, Belgium).

Essential amino acids for bumble bees were considered to be those identified as essential for honey bees (i.e. arginine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, valine and histidine ; De Groot 1953).

3.3.2.3 Phytosterol analysis

Phytosterol content was analysed from 15 *mg* dry pollen of each species, in duplicate or triplicate, according to the method described in Vanderplanck *et al.* (2011). The procedure can be summarized as follows : (i) saponification of the samples with

methanolic potassium hydroxide ; (ii) extraction of the unsaponifiable (USM) part with diethylether and water-washings of the organic phase ; (iii) evaporation of solvent ; (iv) USM fractionation into its components using thin-layer chromatography (TLC) ; (v) derivatization of the sterols (scraped from the silicagel) into trimethylsilyl ethers (TMS) ; and (vi) separation of TMS by Gas Liquid Chromatography (GLC). The total phytosterol content was determined considering all peaks of sterols (upper the limit of detection - LOD) eluted between cholesterol and betulin. Individual sterols, which were quantified on the basis of peak areas from analyses of a cholesterol/betulin solution 0.05 mg/ml , were expressed as percentages of the total sterol content. Identifications were achieved by comparing the relative retention times (β -sitosterol -TMS = 1.00) with those of sunflower oil reference prepared according to Lognay *et al.* 1992. These identifications were checked by GC/MS (Gas Chromatograph/Mass Spectrometer) analyses at the University of Liège (Gembloux, Belgium ; Vanderplanck *et al.* 2011).

3.3.3 Nectar sampling and chemical analyses

We sampled nectar at the peak of flowering of each plant species between late May and early July 2012. To have easier access to the nectar and to avoid pollen contamination, anthers and stigmas were removed from flowers of *Cirsium palustre*, *Lychnis flos-cuculi*, *Persicaria bistorta*, *Trifolium pratense* and *Valeriana repens*. For each plant species, nectar was collected from freshly opened flowers with glass capillary tubes of $0.5 \mu\text{L}$, $1 \mu\text{L}$ or $5 \mu\text{L}$ depending on the nectar quantity (Hirschmann@Laborgeräte, Eberstadt, Germany). The nectar volume was estimated by measuring the length of the nectar column in the capillary tube.

Nectar samples were stored in capillary tubes at -80°C until analyses of their sugar concentration and composition. Sugar composition was determined by gas chromatography, with a Perkin-Elmer Autosystem XL equipped with a split injector (1/20) and helium as the carrier gas (flow of 1 mL/min). The injector and detector temperatures were maintained at 250°C and 350°C , respectively. Sugar analyses for nectar composition were performed in the Centre Apicole de Recherche et d'Information (CARI asbl, Louvain-la-Neuve, Belgium).

3.3.4 Statistical analyses

3.3.4.1 Floral choices and pollen chemical composition

We performed Kruskal-Wallis tests to compare the proportion of different pollen grains and the number of plant species within pollen loads among bumble bee species. We further used Kruskal-Wallis tests to compare polypeptide, amino acid, es-

3.3. Methods

sential amino acid and phytosterol content among the four plant species (i.e. *Cirsium palustre*, *Comarum palustre*, *Trifolium pratense* and *Valeriana repens*).

Both similarities and dissimilarities in chemical compositions (phytosterols and essential amino acids) among the different pollen were visually assessed using non-metric multidimensional scaling ordinations (nMDS) based on Bray-Curtis dissimilarity matrix calculated on concentrations expressed in *mg/g* (absolute abundances). All nMDS plots were generated in R employing two dimensions (applying a conventional cutoff of < 0.2 for the stress value) and 50 runs; using functions from *ecodist* (Goslee & Urban 2007), and *BiodiversityR* (Kindt & Coe 2005). The minimum stress solution was subsequently used to produce the nMDS plots in which each spatial distance between samples can be interpreted as the relative difference in chemical composition (i.e. points that are closer are more similar than points that are more distant).

To test differences in chemical composition among pollen, perMANOVA, a permutation-based version of the multivariate analysis of variance (MANOVA), was performed using the Bray-Curtis dissimilarity matrix and 999 permutations. Like conventional analyses of variances, the perMANOVA calculated a F-statistics by taking the ratio of among-group sums of squares to within-group sums of squares. The multivariate homogeneity of within-group covariance matrices has been verified using the « betadisper » function (R-package *vegan*; Oksanen *et al.* 2013). The returned P-value was used to detect significant differences that reflected changes in abundance and chemical composition (« adonis » command, R-package *vegan*). When a significant difference was detected, multiple pairwise comparisons were conducted on the data to detect precisely the differences and P-values were adjusted using Bonferroni's correction to avoid increases of type error I due to multiple testing. To identify the compounds that were uniquely present in each pollen type, we performed an Indicator Compound Analysis (Indval; Dufrêne & Legendre 1997). This test calculated the probability of a compound being found in association with one particular pollen type (Holm's correction). An indicator value - which was function of a compound relative abundance and relative frequency - was calculated for each chemical and allowed identifying the pollen type with the highest indicator value for each compound (« indval » function, R-package *labdsv*; Roberts 2012). All these multivariate analyses were conducted in R version 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

3.3.4.2 Nectar production and composition

For each plant species investigated for nectar composition, we estimated the sugar ratio (*R*) which is defined as the ratio by weight of sucrose to the combined hexose sugars (i.e. fructose and glucose) : $R = S/(F + G)$, where *S*, *F* and *G* represented the percentage of sucrose, fructose and glucose, respectively (Baker & Baker

1990). Four classes of nectar, depending on sugar ratio, were defined by Baker & Baker (1990) : sucrose-dominant ($R > 1$), sucrose-rich ($0.5 > R > 1$), hexose-rich ($0.1 > R > 0.5$) and hexose-dominant ($R < 0.1$). The volume of produced nectar and relative concentrations in sucrose, fructose and glucose were compared using Kruskal-Wallis tests.

If not indicated otherwise, data are presented as means $\pm$ standard deviation. Analyses were computed with R 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

3.4 Results

3.4.1 Bumble bee floral choices and constancy

About 60.2% of loads were pure in floral composition (i.e. $> 95\%$ conspecific pollen grains ; Appendix B.1) and 86.1% of them contained pure pollen of *Comarum palustre*. Overall, 90.2% of pollen loads contained pollen of *C. palustre*. *Bombus terrestris s.l.* presented lower abundance of individuals carrying pure pollen loads (33.3%) than *B. hypnorum* (63.6%), *B. lapidarius* (75.0%) and *B. pascuorum* (80.0% ; Appendix B.1). The major pollen resource was *Comarum palustre* for the four bumble bee species (Table 3.1). The average proportion of *C. palustre* pollen per load differed significantly among bumble bee species ($\chi^2 = 9.04, d.f. = 3, P < 0.05$; Table 3.1). It was especially high for *B. pascuorum* and *B. lapidarius* (92.6-95.5%). Minor pollen resources depended on bumble bee species. *Angelica sylvestris*, *Galium sp.*, *Ranunculus acris* and *Valeriana repens* were alternative pollen resources for *B. hypnorum* (23% for the four plant species) and *B. terrestris s.l.* (25% for the four plant species) while *B. lapidarius* and *B. pascuorum* did not forage on pollen of these plant species. Moreover, *B. terrestris s.l.* is the only bumble bee species among the four sampled species that collected pollen of *Cirsium palustre* (5%). The number of plant taxa in individual pollen loads ranged from 1 to 7 species (mean = 2.5 ± 0.2 species) though it did not differ significantly among bumble bee species ($\chi^2 = 2.05, d.f. = 3, P > 0.05$; Appendix B.1). Yet, individuals of *B. terrestris s.l.* showed the broadest diet with altogether 12 different plant species over all loads (Appendix B.1 ; Table 3.1).

3.4.2 Pollen composition

3.4.2.1 Polypeptide and total amino acid contents

Polypeptide content of pollen was not significantly different among plant species ($\chi^2 = 6.89, d.f. = 3, P > 0.05$; Table 3.2) and ranged from 1.51% to 4.02% dry matter for *Comarum palustre* and *Trifolium pratense*, respectively.

3.4. Results

TABLE 3.1: Percentage (mean $\pm$ SD) of pollen grains of the different plant species present in pollen loads of *Bombus hypnorum*, *B. lapidarius*, *B. pascuorum* and *B. terrestris*. Only plant species present in more than 2% of the pollen loads are shown. Others species are listed in Appendix B.1. (n=number of analysed pollen loads containing more than 50 pollen grains per load; *= species present in a proportion lower than 0.2%). *Galium* sp. = *Galium palustre* and *G. uliginosum*.

	<i>B. hypnorum</i> (n = 11)	<i>B. lapidarius</i> (n = 12)	<i>B. pascuorum</i> (n = 5)	<i>B. terrestris</i> s.l. (n = 33)
<i>Angelica sylvestris</i>	5.9 $\pm$ 19.5	-	-	0.9 $\pm$ 3.9
<i>Cirsium palustre</i>	*	*	0.2 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 17.5
<i>Comarum palustre</i>	74.6 $\pm$ 41.4	95.5 $\pm$ 8.9	92.6 $\pm$ 13.3	61.6 $\pm$ 42.3
<i>Galium</i> sp.	9.0 $\pm$ 29.2	-	-	3.0 $\pm$ 17.2
<i>Lychnis flos-cuculi</i>	*	0.7 $\pm$ 1.5	0.2 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 20.6
<i>Persicaria bistorta</i>	1.0 $\pm$ 2.6	*	0.4 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.8
<i>Ranunculus acris</i>	0.5 $\pm$ 1.0	-	-	11.3 $\pm$ 29.0
<i>Trifolium pratense</i>	-	2.5 $\pm$ 6.1	5.9 $\pm$ 11.9	0.3 $\pm$ 1.1
<i>Valeriana repens</i>	9.1 $\pm$ 30.2	*	-	10.9 $\pm$ 27.3

Total amino acid content differed significantly among plant species, ranging from 12.42 to 21.59% dry matter ($\chi^2 = 8.46$, d.f. = 3, $P < 0.05$; Table 3.2). *Comarum palustre* and *Trifolium pratense* showed pollen with higher content of essential amino acids (9.85 and 11.22% dry matter, respectively) than *Valeriana repens* and *Cirsium palustre* (6.11 and 8.26%, respectively; $\chi^2 = 8.82$, d.f. = 3, $P < 0.05$; Table 3.2). The relative proportion of essential amino acids significantly differed between plant species as *Trifolium pratense* contained a higher relative concentration of essential amino acids (51.99%) compared to *Comarum palustre* and *Valeriana repens* (46.78 and 46.78%, respectively; $\chi^2 = 9.87$, d.f. = 3, $P < 0.05$; Table 3.2).

TABLE 3.2: Polypeptide and total amino acid contents of the pollen of four studied plant species expressed as percentage of dry weight (mean $\pm$ SD) and essential amino acid proportion expressed as percentage of total amino acid content (mean $\pm$ SD).

	Polypeptide content (%)	Total amino acid content (%)	Essential amino acids (%)
<i>Cirsium palustre</i> (n = 3)	1.66 $\pm$ 0.32	12.42 $\pm$ 2.85	49.17 $\pm$ 0.45
<i>Comarum palustre</i> (n = 3)	1.51 $\pm$ 0.31	21.06 $\pm$ 1.52	46.78 $\pm$ 0.47
<i>Trifolium pratense</i> (n = 3)	4.02 $\pm$ 1.19	21.59 $\pm$ 2.76	51.99 $\pm$ 0.11
<i>Valeriana repens</i> (n = 3)	1.78 $\pm$ 0.37	17.71 $\pm$ 3.11	46.65 $\pm$ 0.24

PerMANOVA detected a significant difference in composition of essential amino acids (free and protein-bound pooled) among the pollen ($F_{3,10} = 8.62$, $P < 0.01$). Pairwise comparisons indicated a significant difference between *Cirsium palustre* and *Comarum palustre* ($F_{1,5} = 15.33$, $P < 0.001$) but did not clearly arrange the different species into groups. As shown by nMDS ordination, the different species overlapped despite some slight differences (stress value = 0.019, Figure 3.1). Moreover the essential amino acid profiles were quite similar among the species, as

Indicator Compound Analysis did not detect significant associations between any essential amino acid and any pollen type. Regardless non essential amino acids, pollen of *Cirsium palustre* contained higher relative abundances of glutamic and aspartic acids and less proline than the three other plant species ($\chi^2 = 10.49 - 10.83$ respectively, $d.f. = 3$, $P < 0.05$; Figure 3.2).

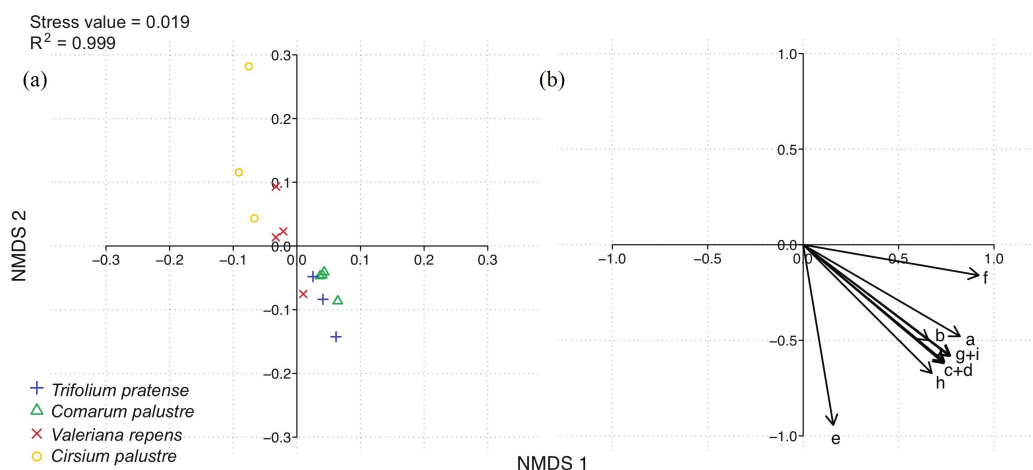


FIGURE 3.1: nMDS ordination plot based on Bray-Curtis distances calculated on abundances (mg/g) of essential amino acids in pollen of four plant species : (a) replicates within species and (b) essential amino acid vectors with a, arginine; b, histidine; c, isoleucine; d, leucine; e, lysine; f, methionine; g, phenylalanine; h, threonine and i, valine. Stress value = 0.019 and $R^2 = 0.999$.

3.4.2.2 Phytosterol content

Total phytosterol contents ranged from 4.84 to 10.50% dry matter for *Valeriana repens* and *Trifolium pratense*, respectively (Table 3.3). The major phytosterols were the 24-methylenecholesterol/ campesterol fraction (14.22-61.21%), β -sitosterol (5.21-29.88%) and δ^5 -avenasterol (10.62-23.20%; Table 3.3). The relative concentrations of cholesterol, desmosterol (except for *Comarum palustre*), stigmasterol, cholestenone, δ^7 -avenasterol and β 7-stigmasterol (except for *Cirsium palustre*) were lower than 10% (Table 3.3).

PerMANOVA detected a significant difference in sterol composition among the four pollen ($F_{3,5} = 53.04$, $P < 0.001$). Pairwise comparisons and nMDS ordination arranged the different species into three distinctive groups (stress value = 0.084; Figure 3.3) : (i) one including *Trifolium pratense* and *Valeriana repens* ($F_{1,3} = 81.07$, $P = 0.066$), (ii) one, intermediate, with *Comarum palustre*, which did not significantly differ from *Trifolium pratense* ($F_{1,3} = 24.54$, $P > 0.05$) and *Cirsium palustre* ($F_{1,2} = 35.97$, $P > 0.05$), and (iii) one with *Cirsium palustre*. Indicator Compound Analysis

3.4. Results

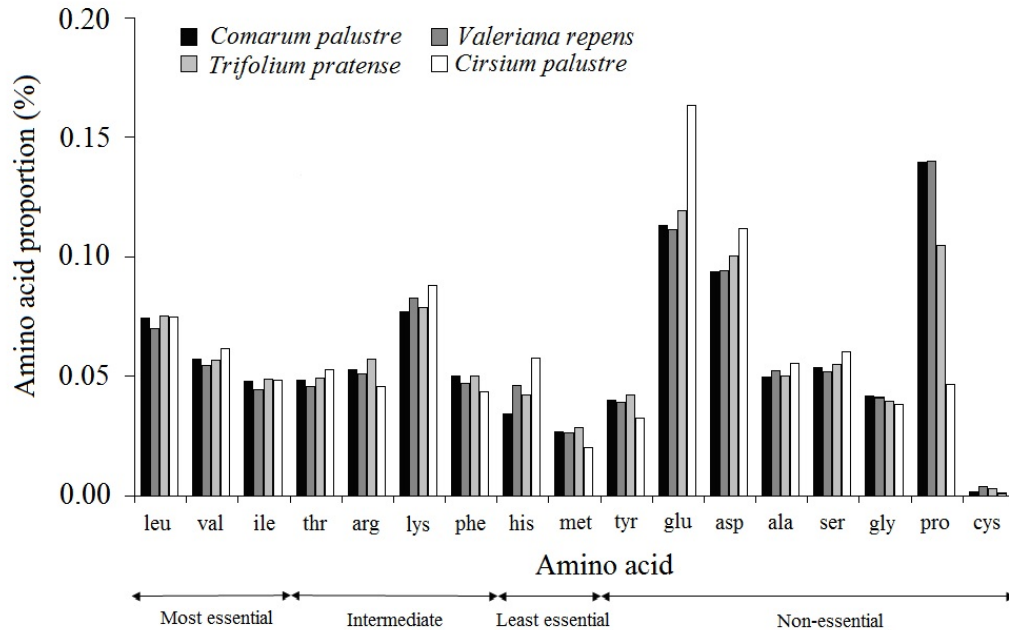


FIGURE 3.2: Total amino acid profiles of the four different pollen species (*Comarum palustre*, *Trifolium pratense*, *Valeriana repens* and *Cirsium palustre*). The amino acids are ordered into four groups according to their relative required amounts in the diet of the honey bee : most, intermediate, least and non-essential (De Groot 1953). (leu = leucine, val = valine, ile = isoleucine, thr = threonine, arg = arginine, lys = lysine, phe = phenylalanine, his = histidine, met = methionine, glu = glutamic acid, asp = aspartic acid, ala = alanine, ser = serine, gly = glycine, pro = proline, cys = cysteine).

did not reveal significant sterol/pollen association. However, pollen of *Cirsium palustre* displayed high amount of δ^7 -stigmasterol (24.25-30.05%).

3.4.3 Nectar volume and composition

A flower of *Comarum palustre* produced significantly higher amount of nectar than a flower of others plant species ($\chi^2 = 238.1, d.f. = 5, P < 0.001$; Table 3.4). Nectar production was the highest at the flower head level for *Persicaria bistorta* (14.9 μL) and *Trifolium pratense* (20.9 μL). Flowers of *Comarum palustre* presented hexose-dominant nectar ($R = 0.01$) whereas other plant species were sucrose-rich (*Persicaria bistorta*; $R = 0.82$) or sucrose-dominant (*Lychnis flos-cuculi*, *Valeriana repens*, *Cirsium palustre*, *Trifolium pratense*, $R = 1.23 - 11.28$; Table 3.4). Overall, nectars differed significantly in their fructose, glucose and sucrose concentrations ($\chi^2 = 14.2 - 15.6, d.f. = 5, P < 0.05$; Figure 3.4). *Comarum palustre* presented the highest concentration in glucose and fructose (0.26 and 0.28 mg/g , respectively), whereas *Lychnis flos-cuculi* presented the highest concentration in sucrose (0.05

CHAPITRE 3. Pollen and nectar quality drive major and minor floral choices of
bumble bees

mg/g).

TABLE 3.3: Sterolic compounds for four studied species (range). The concentrations are expressed as percentage of total sterolic compounds. Plant species are ordered according to overall decreasing abundance among corbicular pollen loads. The three major sterols in the investigated samples are in bold. < LOD, under limit of detection.
^a Under the analytical conditions applied campesterol and 24-methylenecholesterol were nearly impossible to separate ; the results were therefore pooled.

Sterols	<i>Comarum palustre</i> (n = 2)	<i>Valeriana repens</i> (n = 2)	<i>Trifolium pratense</i> (n = 3)	<i>Cirsium palustre</i> (n = 2)
Cholesterol	2.19-2.71	5.68-5.81	1.24-3.30	6.22-6.27
Desmosterol	10.10-11.97	< LOD	< LOD	7.43-9.09
24-Methylenecholesterol/ campesterol ^a	36.60-37.06	34.19-37.26	53.55-61.21	14.22-17.19
Stigmasterol	1.87-2.15	4.20-4.99	1.67-3.11	2.33-2.46
β -sitosterol	17.94-18.43	29.25-29.88	5.21-10.35	17.43-17.81
$\delta 5$ -avenasterol	19.22-19.75	10.62-12.83	20.99-23.20	13.11-15.12
Cholestenone	1.61-3.54	2.84-3.24	2.35-3.18	1.81-4.08
$\delta 7$ -stigmasterol	2.46-6.91	5.30-5.73	2.32-3.55	24.25-30.05
$\delta 7$ -avenasterol	2.25-3.24	3.20-3.37	1.04-1.70	4.99-6.13
TOTAL (%)	7.59-9.01	4.84-5.21	9.98-10.50	5.26-5.39

TABLE 3.4: Nectar volume produced per flower (mean $\pm$ SD), number of flowers per inflorescence head (mean $\pm$ SD), nectar volume per inflorescence and nectar sugar ratio ($R = S/(F + G)$) of the six studied plant species : *Cirsium palustre*, *Comarum palustre*, *Lychnis flos-cuculi*, *Persicaria bistorta*, *Trifolium pratense* and *Valeriana repens*. Species are ordered according to overall decreasing abundance among pollen loads.

	Nectar volume (μ l)	Number of flowers per inflorescence	Nectar volume per inflorescence (μ l)	R
<i>Cirsium palustre</i> (n = 25)	0.04 $\pm$ 0.07	47.7 $\pm$ 7.8	1.92	7.69
<i>Comarum palustre</i> (n = 15)	1.29 $\pm$ 1.01	6.6 $\pm$ 2.7	9.03	0.01
<i>Lychnis flos-cuculi</i> (n = 20)	0.50 $\pm$ 0.16	11.6 $\pm$ 6.7	6.00	1.23
<i>Persicaria bistorta</i> (n = 25)	0.09 $\pm$ 0.09	164.4 $\pm$ 64.7	14.85	0.82
<i>Trifolium pratense</i> (n = 20)	0.19 $\pm$ 0.18	110.2 $\pm$ 36.7	20.90	11.28
<i>Valeriana repens</i> (n = 25)	0.02 $\pm$ 0.02	232.8 $\pm$ 51.4	4.66	1.79

3.4. Results

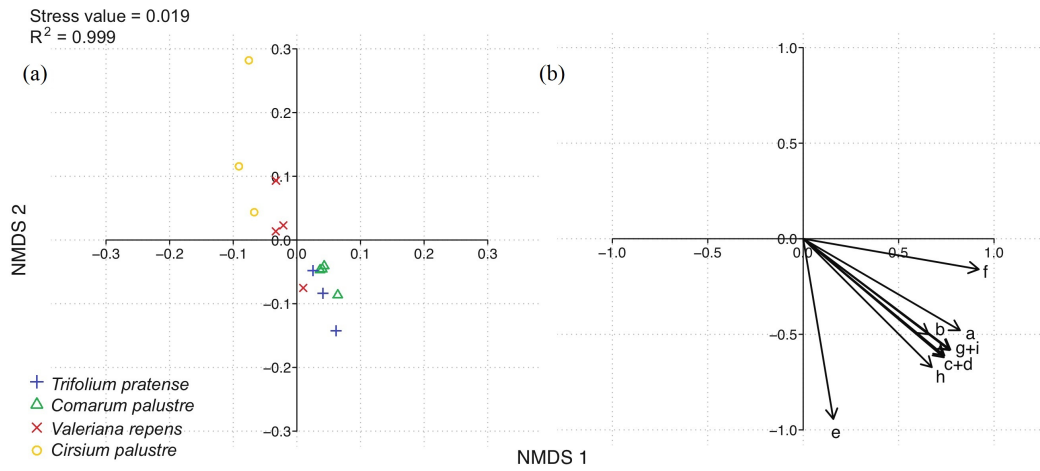


FIGURE 3.3: nMDS ordination plot based on Bray-Curtis distances calculated on abundances (mg/g) of phytosterolic compounds in pollen of four plant species : (a) replicates within species and (b) sterolic vectors with a, cholesterol ; b, desmosterol ; c, 24-methylenecholesterol/campesterol ; d, stigmasterol ; e, β -sitosterol ; f, δ 5-avenasterol ; g, cholestenone ; h, δ 7-stigmasterol and i, δ 7-avenasterol Stress value = 0.0184 and R² = 0.971.

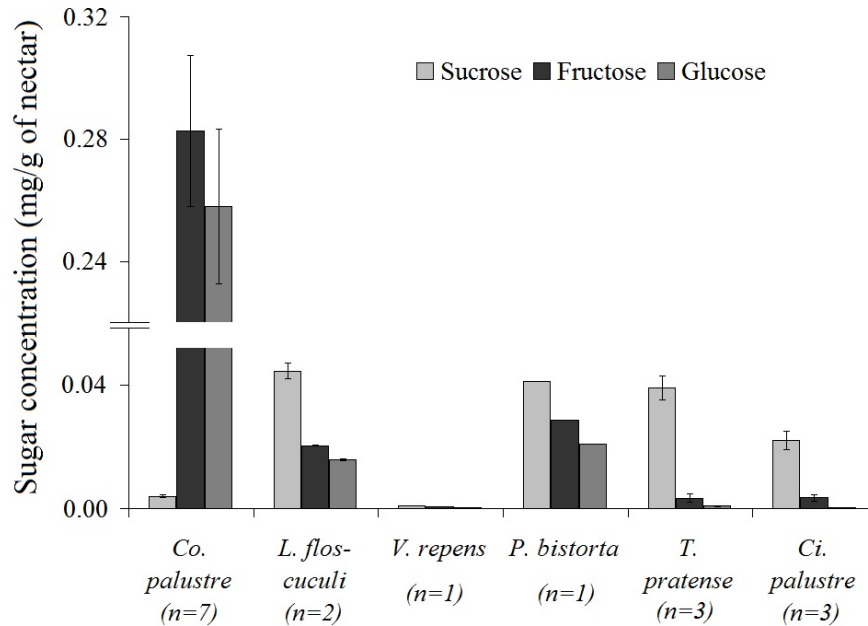


FIGURE 3.4: Sugar concentration (mean $\pm$ SE) in the nectar of the six species investigated for nectar composition. Species are ordered according to decreasing abundance among corbicular pollen loads.

3.5 Discussion

3.5.1 Bumble bee floral choices

Analysing pollen loads of bumble bee individuals allowed determining their pollen resources and their relative constancy. Bumble bee individuals sampled on flowers of *Comarum palustre* were highly constant during pollen collection. However, like previously showed in other studies (e.g. Goulson & Darvill 2004 ; Carvell *et al.* 2006b), differences were observed among bumble bee species in their degree of host-plant specialisation and constancy. *Bombus lapidarius* and *B. pascuorum* showed higher constancy than *B. terrestris* s.l.. In particular, pollen loads from *B. lapidarius* and *B. pascuorum* contained almost 100% pollen from *Comarum palustre*, *Lychnis flos-cuculi* or *Trifolium pratense*, whereas pollen loads of *B. terrestris* s.l. contained up to four major pollen species. Pollen loads of *B. hypnorum* were mainly composed of pollen from *Comarum palustre*, *Persicaria bistorta* or *Ranunculus acris*. Overall, individuals of *B. terrestris* s.l. showed a wider diet breadth (12 plant species) than did the three other bumble bee species (6-8 plant species). This result is not surprising as *B. terrestris* is considered as the most polylectic of bumble bee species (Goulson 2009). Our results on diet breadth of *B. lapidarius* in peaty wet meadows further support the results in agricultural landscapes (Carvell *et al.* 2006b ; Connop *et al.* 2010 ; Leonhardt & Blüthgen 2012). However, studies showed that *B. lapidarius* can also present diet breadth as large as other co-occurring bumble bee species or even larger (Goulson & Darvill 2004 ; Kleijn & Raemakers 2008). The same kind of opposite results has been shown for *B. pascuorum*, as two studies showed this species as less specialized than *B. terrestris* (Carvell *et al.* 2006b ; Leonhardt & Blüthgen 2012). These conflicting results about the diet breadth of *B. lapidarius* and *B. pascuorum* suggested that the relative diet breadth of these species might be more related to local and temporal conditions than fixed specific preferences (Roulston & Goodell 2011).

The majority of plant species identified in pollen loads were present within the three sites. Though, some of the plant species (*Ranunculus acris* and *Trifolium pratense*) occurred at the margins of the wet meadows or in hay meadows in the surrounding area. Their relative abundance in pollen loads (2.3-26.0% and 0.1-27.0%, respectively) might reflect interactions between peaty wet meadows and these margins and hay meadows. The latter usually represents potential nesting sites for the four bumble bee species sampled (Benton 2006). Further investigations on bumble bee species movements between the peaty wet meadows and the landscape might provide further information about the interactions between the different biotope types.

3.5.2 Quality of pollen rewards

Investigated pollens differed in their total amino acid content, though they were similar in their relative abundance and full spectrum of essential amino acids. The latter are consistent with previous studies suggesting that amino acid composition is conserved among plant species (Roulston & Cane 2000 ; Weiner *et al.* 2010). Total amino acid content and related nitrogen content have been reported to differ widely among plant species (Roulston & Cane 2000) and seem to be positively correlated with larva weight and development, particularly with more than 20% total protein content (Génissel *et al.* 2002 ; Tasei & Aupinel 2008). Therefore, pollen of *Comarum palustre* and *Trifolium pratense* might be considered as pollen of high chemical value as they show total amino acid content higher than 20%, whereas pollen of *Cirsium palustre* would be low quality pollen. Our results further indicated that relative abundance of non-essential amino acids in pollen widely varied between investigated plant species. In particular, pollen of *Comarum palustre*, *Valeriana repens* and *Trifolium pratense* showed higher relative abundance of proline than *Cirsium palustre*. This non-essential amino acid has been reported in high proportions in pollen collected by honey bees and bumble bee species (Leonhardt & Blüthgen 2012), which is not surprising as this component is involved in bee flight (Carter *et al.* 2006). On the contrary, *Cirsium palustre* showed the highest relative abundance of aspartic and glutamic acids, involved in nitrogen assimilation by bees (Roulston & Cane 2000) and found in high concentrations in pollen collected by bumble bee species (Leonhardt & Blüthgen 2012). These results further support the dependence of bumble bee species on multiple pollen resources to meet their food requirements.

Pollen of *Comarum palustre* and *Trifolium pratense* contained higher proportions of phytosterols than *Valeriana repens* and *Cirsium palustre*. However, relative abundance of phytosterols was similar among the four plant species with 24-methylenecholesterol / campesterol, β -sitosterol and δ 5-avenasterol as main phytosterols. The 24-methylenecholesterol has been reported to be among the most important phytosterols for bees (Svoboda *et al.* 1980 ; Human *et al.* 2007). The β -sitosterol and δ 5-avenasterol have been reported to have a phagostimulant effect on bumble bee species (Rasmont *et al.* 2005b). *Cirsium palustre* contained high relative proportion of δ 7-stigmasterol which is a common sterol to several Asteraceae (Janson *et al.* 2009). This phytosterol might represent a chemical protection of pollen as it has been reported to be detrimental to herbivorous insects lacking the enzymes (specifically isomerases) necessary to completely convert δ 7-sterols to δ 5-sterols (Janson *et al.* 2009 ; Sedivy *et al.* 2011).

Here, we highlighted that *Comarum palustre* and *Trifolium pratense* offered pollen of high chemical quality to bumble bee species due to their high amino acid content (including essential amino acids) and phytosterol composition. Pollen of *Valeriana repens* and *Cirsium palustre* would then be considered as less valuable pol-

len resources for bumble bee species due to their lower amino acid and phytosterol content, and for the high relative proportion of δ^7 -stigmasterol (*Cirsium palustre*).

3.5.3 Quality of nectar rewards

Nectar volume was relatively abundant at the flower level for *Comarum palustre* and at the flower head level for *Persicaria bistorta* and *Trifolium pratense*. Sugar ratio differed between investigated plant species as *Comarum palustre* offered hexose-dominant nectar, *Persicaria bistorta* offered sucrose-rich nectar and the four other species offered sucrose-dominant nectar. Our results, except for *Persicaria bistorta*, which nectar was not yet analysed, are supported by a previous study of Percival (1961). Flower morphology influenced sugar ratio as higher proportions of hexose compared to sucrose are typical of open flowers such as *Comarum palustre* and related to high invertase activity (Nicolson 2011). In particular, Percival (1961) reported plant species belonging to the Rosaceae (e.g. *Comarum palustre*) to produce nectar of equal parts of fructose and glucose. *Comarum palustre* offered nectar with high concentration in fructose (0.28 mg/g) whereas *Lychnis flos-cuculi*, *Persicaria bistorta* and *Trifolium pratense* offered nectar with high concentration in sucrose (0.05, 0.04 and 0.04 mg/g, respectively). Highly concentrated nectars, particularly in hexose, are related to the open flower morphology favouring water evaporation (Harder 1986).

Flowers of *Comarum palustre* offered therefore abundant nectar with high sugar concentration. More rewarding plant species were *Lychnis flos-cuculi* and *Persicaria bistorta* in the peaty wet meadows.

3.5.4 Effect of reward quality on floral choices

Interestingly, plant species offering pollen of high qualitative value (i.e. high essential amino acid and phytosterol content) were dominant in the diet of the four sampled bumble bee species. These results confirm previous studies showing that bumble bees are able to evaluate the chemical quality of their resources (Kitaoka & Nieh 2009) and to forage on pollen showing high protein content (Hanley *et al.* 2008 ; Leonhardt & Blüthgen 2012). However, as *C. palustre* presented large stands of high flower density among study sites, foraging preferences of bumble bee individuals might also be related to the relative abundance of host plants (Sowig 1989 ; Leonhardt & Blüthgen 2012).

Our results further highlighted the dependence of polylectic bumble bee species on multiple floral resources for pollen, which has been experimentally shown to positively influence larval development in raised colonies of *B. terrestris* (Génissel *et al.* 2002 ; Pelletier & McNeil 2003 ; Tasei & Aupinel 2008). Although, diet breadth associated to chemical components was not similar among the four bumble bee species.

3.6. Acknowledgments

While *B. lapidarius* and *B. pascuorum* focused their pollen collection on plant species showing high amino acid content (i.e. *Comarum palustre* and *Trifolium pratense*), *B. hypnorum* and *B. terrestris* s.l. expanded about 25% of their diet on plant species offering less valuable pollen. These results confirm the study of Leonhardt & Blüthgen (2012), which showed that *B. pascuorum* foragers collected pollen containing more protein than pollen collected by *B. terrestris* foragers. As the relative host-plant specialization of *B. pascuorum* and *B. terrestris* are variable (see before), differences in floral choices of the two bumble bee species might therefore be more driven by pollen chemical quality than by preference for particular plant taxa.

Our results also suggest that bumble bee competition for pollen of high chemical quality might be higher than for pollen of low quality. *Bombus hypnorum* and *B. terrestris* s.l. seemed able to increase their diet breadth on less valuable and competed rewards. Although a previous study of Fontaine *et al.* (2008) reported individuals of *B. terrestris* to enlarge their diet breadth under high competition for resources, we showed that it might be at the expense of pollen chemical quality. Moreover *B. terrestris* s.l. was the only bumble bee species which collected pollen of *Cirsium palustre* (up to 77% of pollen loads), although this pollen might be considered as very poor quality pollen as it contained low concentration of amino acids and high relative abundance of δ^7 -stigmaterol. Many insect species are not able to metabolize the δ^7 -stigmaterol as they lack the enzyme to break the δ^7 -bound (Canavoso *et al.* 2001 ; Janson *et al.* 2009).

Finally, differences in pollen foraging strategies among bumble bee species cannot be explained by colony cycle length, tongue length nor body size, as *B. terrestris* s.l. and *B. lapidarius* are similar in these features (Goulson & Darvill 2004 ; Benton 2006 ; Carvell *et al.* 2006b). We hypothesized that larvae of *Bombus terrestris* s.l. and *B. hypnorum* might easily assimilate pollen of poor chemical quality. Further investigations by comparative studies of bumble bee colony rearing on various monofloral diets might be helpful to test this hypothesis.

3.6 Acknowledgments

The authors thank the Belgian Fund for Scientific Research (FNRS contract 2.4540.09) for funding this research. L. Somme holds a FRIA fellowship (Funds for training in Industry and Agriculture Research) and M. Vanderplanck holds an aspirant FNRS fellowship. The study was conducted in accordance with current Belgian laws. We thank the « Département de la Nature et des Forêts » (DNF, Région Wallonne, Belgium) for the derogation concerning the sampling of plant and insect individuals in nature reserves, and the DNF and Natagora for granting access to their properties. We thank also Christel Buyens and Isabelle Van de Vreken for technical assistance.

Deuxième partie

Caractérisation de la structure génétique des populations

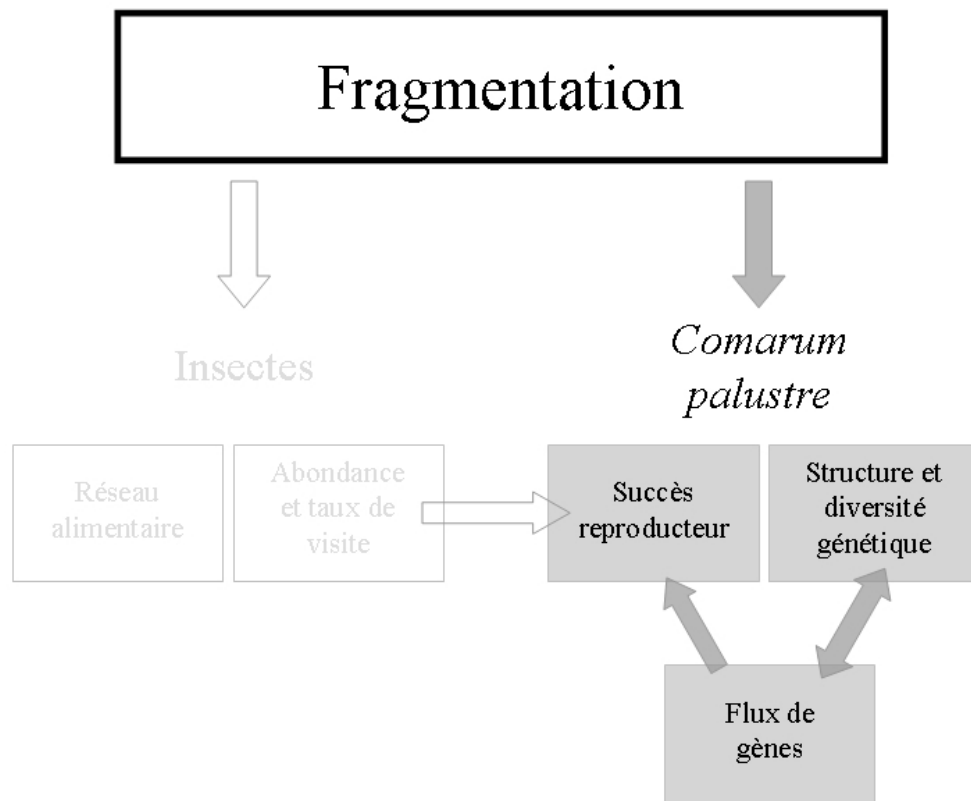


FIGURE 3.5: Les populations végétales issues de la fragmentation sont généralement considérées comme appauvries génétiquement et/ou consanguines. Ceci pourrait compromettre leur persistance à long terme. Le mode de reproduction peut également avoir une influence sur la démographie de ces populations. Le premier chapitre de cette deuxième section décrit le protocole mis en place pour la mise au point des marqueurs microsatellites. Dans le deuxième chapitre de cette section, les marqueurs ont servi au génotypage des individus de populations de *Comarum palustre* et permis de déterminer la structure et la diversité génétique de ces populations, ainsi que le mode de reproduction et les flux de gènes.

Chapitre 4

Development and multiplexing of microsatellite markers using pyrosequencing in the clonal plant *Comarum palustre* (Rosaceae)¹

4.1 Abstract

Microsatellites represent one of the most commonly used genetic markers for population genetic studies. Traditionally, their development is quite time consuming, requiring construction of a genomic library enriched for repeated motifs. Using pyrosequencing, a fast and cost-effective new generation sequencing technique, we produced 24 340 862 bases in 63 860 short fragment reads, including 1 170 dinucleotide motifs with a minimum of six repeats and 1 383 trinucleotide motifs with a minimum of four repeats for the marsh cinquefoil, *Comarum palustre* L., an endangered marsh pioneer species. We selected 58 loci with SSR segments (at least ten repeats) for a preliminary screening. Out of them, we screened 29 loci on a capillary sequencer after ligation in a vector and PCR using T7 forward primer labelled with FAM fluorescent dye and the specific unlabeled reverse primers. This procedure allowed us to screen large number of candidate loci with the same labelled primer and unlabelled specific primers. Finally, we characterized 20 polymorphic microsatellite

1. Somme, L., Raabová, J., Jacquemart, A.L., and Raspé, O. 2012. Molecular Ecology Resources, 12(1) : 91-97.

markers, nine dinucleotides and 11 trinucleotides. We used these markers to assess genetic diversity and clonal structure in two Belgian populations. All loci showed a maximum of two alleles per individual, suggesting they are from a diploid genome. One genet was detected in a newly extending population while 53 different genets in a long-term ecologically managed population. The number of alleles per locus ranged from 6 to 14 in this old population with an expected heterozygosity, ranging from 0.5964 to 0.8278. These preliminary results show a genet size up to 7.2 *m*.

4.2 Introduction

In the last few decades, microsatellites have emerged as one of the most commonly used genetic markers for population genetic studies. Their genetic codominance, multi-allelic variation, distribution throughout the genome, high reproducibility and high-resolution make them particularly suitable and powerful genetic markers for studies at the population and individuals levels, both in animals and plants (Oliveira *et al.* 2006 ; Abdelkrim *et al.* 2009 ; Duran *et al.* 2009). Traditionally, microsatellite development requires the construction of a genomic library enriched for repeated motifs, screening and sequencing of microsatellite-containing clones and primer design (Zane *et al.* 2002 ; Abdelkrim *et al.* 2009).

Recently, a new generation sequencing technique, pyrosequencing, has been developed and offers the potential to rapidly sequence either whole genomes or representative samples of genomes (Abdelkrim *et al.* 2009 ; Duran *et al.* 2009 ; Arif *et al.* 2010). Compared to usual techniques such as construction of libraries enriched for SSR sequences, pyrosequencing represents a significant gain in time and cost. It produces millions of base pairs of short fragment reads, which may be screened using bioinformatics toolsets to identify primers that amplify polymorphic microsatellite loci (Abdelkrim *et al.* 2009 ; Duran *et al.* 2009). It has recently been tested on animal species, such as the blue duck (*Hymenolaimus malacorrhynchus* ; Abdelkrim *et al.* 2009), the apple maggot (*Rhagoletis pomonella* ; Schwarz *et al.* 2009), the Rhone streber (*Zingel asper* ; Dubut *et al.* 2010), the honey bee (*Apis mellifera*) and the zebrafish (*Danio rerio*) (Martin *et al.* 2010). But this method has only -seldom been used to isolate microsatellite loci in plants (Csencsics *et al.* 2010 ; Buehler *et al.* 2011).

We tested this technique for a rare perennial plant, *Comarum palustre* L. (syn. *Potentilla palustris* (L.) Scop ; Rosaceae). It is a perennial plant with a boreo-circumpolar distribution (Olesen & Warncke 1992). The species occurs in different vegetation types across Europe like peat bogs, fens, wet meadows and water body edges where it acts as a pioneer species (Macek & Lepš 2007). The species reproduces sexually, but also clonally propagates by long lignifying rhizomes (Olesen & Warncke 1992 ;

4.3. Methods

Macek & Lepš 2007). The flowering season lasts from May to July (Lawalrée 1961 ; Lambinon *et al.* 2004). *Comarum palustre* is visited by a wide array of insects, in particular Diptera, Hymenoptera and Lepidoptera (Olesen & Warncke 1992 ; Guillén *et al.* 2005). *Comarum palustre* is considered as rare and threatened throughout Western Europe (Bournérias *et al.* 2001). This is mainly due to the fact that, as a pioneer species, its occurrence is restricted to very specific biotopes which have been largely fragmented through destruction and forest recolonisation since the middle of the 19th century (Frankard *et al.* 1998 ; Verté 2007). Quantifying genetic diversity and gene flow within and among the remaining endangered populations is important to design appropriate management plans for long-term persistence of the populations.

4.3 Methods

To identify microsatellite loci *de novo* for *Comarum palustre*, we used the high-throughput genomic sequencing technology. We extracted genomic DNA from ca. 100 mg fresh leaf tissue of one individual from a Belgian population (Stockem, 49°40'28.49" N, 5°46'18.21" E) using E.Z.N.A. HP Plant DNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA) with RNase treatment. The purified DNA was subjected to pyrosequencing by Macrogen (Seoul, Republic of Korea) using 1/8 of a plate on a GS FLX Titanium platform (454 Sequencing, Roche Applied Science). We used MSAT-COMMANDER (Faircloth 2008) to screen the pyrosequencing reads for microsatellite motifs and to design primers. To avoid designing primers for any locus twice, we compared all sequences of the same SSR repeat (containing also the reverse complement repeats, e.g., CTT and AAG, respectively) in BioEdit ver. 7.0.5 (Hall 1999). We designed both forward and reverse primers for the amplification of 58 pure microsatellites with a minimum number of 10 repeats. We redesigned some primers using PRIMER3 ver. 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000) using the following criteria : optimal primer size of 20 bp (min = 18, max = 25 bp), optimal primer TM of 60 °C (min = 57, max = 63 °C), optimal GC content of 55% (min = 20, max = 80%) and product size of 100-300 bp. We altered product size ranges so that we obtained some small, intermediate and large products that could be labelled with the same dye for multiplexing (see Table 4.1).

To test for amplification consistency and specificity of the primer pairs, we conducted PCR amplification on seven DNA samples, each from a different population. DNA was isolated from ca. 75 mg leaf tissue using a CTAB method (Doyle & Doyle 1990). We estimated the concentration of genomic DNA extracts with the Qubit Quantitation Platform (Invitrogen) and standardized the DNA samples to a concentration of 1 ng.µL⁻¹. For the PCR, we used HotStarTaq Plus Master Mix (QIAGEN, Hilden, Germany). The PCR reaction mix contained 4 µL of DNA, 0.25 µL of each primer (at 100 µM concentration), 10 µL of Master Mix and 5.5 µL of RNase-free water.

Thermocycling consisted in one denaturation step of 5 *min* at 95°C ; 35 cycles of 30 *sec* at 94°C, 30 *sec* at 55°C and 30 *sec* at 72°C ; and finally one elongation step of 7 *min* at 72°C. All PCR reactions were performed on a PE2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). We checked amplification success on 1.5% agarose gel with ethidium bromide.

PCR products that showed positive amplification on agarose gel were ligated into the pJET1.2.blunt cloning vector containing T7 promoter. We selected four different individuals for the ligation (out of seven individuals, see above). To reduce costs of this prescreening test, we mixed PCR products of several loci before the ligation, namely seven loci in each of two ligation reactions, six loci in two other ligations and three loci in the last ligation (in total 29 loci in five ligation reactions). First, we purified PCR products with MinElute PCR purification Kit (Qiagen) with the following volumes : we mixed 10 μL of each PCR product and eluted the DNA in 50 μL of EB buffer. After that, we ligated the PCR fragments into the pJET1.2.blunt cloning vector using Clone JET PCR Cloning Kit (Fermentas, Burlington, Canada). After ligation, we adjusted the DNA concentration for PCR to 1 : 25. Then, for each locus, we performed PCR amplification from ligation product with T7 forward primer labelled with FAM fluorescent dye (Eurogentec) and the specific unlabelled reverse primers. We electrophoresed the PCR products on an ABI3100 capillary sequencer with GS400HD size standard (Applied Biosystems). We analyzed the electrophoregrams with GeneMapper version 3.7 (Applied Biosystems), and selected markers according to their profiles (i.e., sharp peaks, low stuttering, amplification of a single locus, and low background/unspecific amplification). For these markers, we used forward primers labelled with FAM, HEX or Dragon Fly Orange (DFO) fluorescent dyes (Eurogentec, Belgium). This pre-screening procedure is cost-effective because it allows to screen large number of candidate loci with a single, universal fluorescently labelled primer and unlabelled specific primers, and to select the loci most likely to be informative for which specific labelled primers may be ordered.

To estimate the allelic range of each marker and design multiplex PCR primer sets, we analyzed a batch of 16 leaf samples. To maximize allelic diversity in the batch, those 16 leaves were sampled in 15 populations from Belgium and Grand-Duchy of Luxembourg. The distances between populations ranged from 1 to 63 *km*. We extracted DNA from ca. 75 *mg* of fresh young leaf tissue using the CTAB method (Doyle & Doyle 1990) and standardized it to a concentration of 1 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. We first amplified each locus separately by PCR, with QIAGEN HotStarTaq Plus Master Mix (for reaction mixture and cycling parameters, see above). Then, we performed multiplex PCR reactions with the same samples (standardized to a concentration of 5 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) with Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen). We used seven primer pairs in the first two multiplexes and six primer pairs in the third multiplex (Table 4.1). The multiplex PCR reactions contained 2 μL of DNA, 2 μL of the primer mix (each primer at 2 μM in TE pH 8.0), 10 μL of Type-it Master Mix and 6 μL of RNase-free water.

4.3. Methods

Thermocycling consisted in a denaturation step of 5 *min* at 95 °C ; 30 cycles of 30 *sec* at 95 °C, 60 *sec* at 55 °C and 30 *sec* at 72 °C ; and finally an elongation step of 30 *min* at 60 °C. We checked if the peaks obtained from multiplex reactions corresponded to those from single-locus PCRs.

We tested the usefulness of the markers for population genetic studies in a set of 157 leaves sampled in two Belgian populations [Stockem and Vance (Stockem : 49°40'30.62"N, 5°46'14.19"E, 32 leaf samples ; Vance : 49°40'17.91"N, 5°40'47.51"E, 125 leaf samples)]. The sampling scheme in Stockem was rectangular and limited to $2.0 \times 2.5m$ following a grid of $0.5 \times 0.5m$, according to the population size and geometry (Figure 4.1(a)) with additional three samples in the vicinity. The sampling in Vance was realised in a quadrat limited to $20 \times 20m$ with a grid of $2.0 \times 2.0m$ (Figure 4.1(a)), according to the square regular sampling scheme (Arnaud-Haond *et al.* 2007). Another smaller sampling was performed in Vance in a quadrat limited to $2.0 \times 2.0m$ following a grid of $0.5 \times 0.5m$ (Figure 4.1(b)).

The presence of null alleles, which could bias estimates of allele and genotype frequencies by detecting more homozygotes than there really are, was checked on the basis of genet allele frequencies observed in the population of Vance using MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004). To detect the possible presence of null alleles, MICRO-CHECKER constructed random genotypes by randomizing the observed alleles for each locus within samples. The observed genotypes were then compared with the distribution of randomized genotypes. When most allelic classes [with allele frequency $p > (2Nq_{null}) - 1$, in which p was the allele frequency, N the total number of samples analysed and q_{null} the estimated null allele frequency (using Brookfield (1996) algorithm)] showed a homozygote excess, the application warned of a potential null allele.

CHAPITRE 4. Development and multiplexing of microsatellite markers using
pyrosequencing in the clonal plant *Comarum palustre* (Rosaceae)

TABLE 4.1: Characteristics of 20 microsatellite markers developed for *Comarum palustre*. For each marker, forward and reverse sequence, repeat type, size of the original fragment (bp), and allele size range estimated in 16 leaf samples from 15 populations, annealing temperature (T_a), multiplex number - fluorescent dye, and GenBank accession number are given.

Marker	Sequence	Repeat	Size	Size range	T_a	Multiplex-Dye	GeoBank#
Co-GAT1	F : TCTTCTGCTGGTTGTCGT R : TCGGGATCTTCTGATGATGA	(GAT) ₁₁	119	91-121	55	1-FAM	JN165366
Co-CTT2	F : TGCTTCTCATCTATCCTAAACACAG R : AGCTTGCTTGCCCATATTCG	(CTT) ₁₆	175	141-204	55	1-FAM	JN165367
Co-CTT9	F : TCTCTAGTTGATACATTGATGCTT R : GTAACGAGGAGGCAGCAGAC	(CTT) ₁₁	252	239-293	55	1-FAM	JN165368
Co-CTT14	F : GTTGTCCAGCACCGAAAAAG R : AAAAAGCTCAACGTCGCAAT	(CTT) ₁₀	126	109-139	55	1-HEX	JN165369
Co-CTT6	F : CAAGGATTTCTGGTGTGCTC R : CCGAAAGACAAAACATGAAGC	(CTT) ₁₂	197	169-205	55	1-HEX	JN165370
Co-CTT11	F : ATCCCATTCATCGATCTTGC R : GAAATGCCCACTTTCCATGT	(CTT) ₁₁	256	239-264	55	1-HEX	JN165371
Co-CTT10	F : GCGCCTGAGTTCTTTGATCT R : AGACTCGCTGGAACACCAAG	(CTT) ₁₁	219	206-236	55	1-DFO	JN165372
Co-AC1	F : GCAGACATGCACTTCCTCAA R : CATGCAAAGATCAGGGTTCA	(AC) ₁₂	131	111-129	55	2-FAM	JN165373
Co-CTT8	F : TCTTCGTTTGAAAAATTTGAGG R : TGCCTTTGCACCAAACATAGC	(CTT) ₁₁	210	190-231	55	2-FAM	JN165374
Co-CT4	F : CGCCAAAGATTGCTGTTCTT R : GCTGCTTCTAGCTTCTTCGTTT	(CT) ₁₁	132	121-135	55	2-HEX	JN165375
Co-CTT12	F : TGACGTGATTCTTTTCCTTCC R : ACATTGGGGAATCTCAGCAC	(CTT) ₁₁	215	195-231	55	2-HEX	JN165376
Co-CT8	F : CCATTTCAGTTAATCGACCATCA R : GAAATCCGTCGATGCAGAAC	(CT) ₁₀	265	255-267	55	2-HEX	JN165377
Co-AG2	F : CCATAGCTTCTTGCCACC R : ATAGCTCTCCACCCTCCCC	(AG) ₁₆	161	145-167	55	2-DFO	JN165378
Co-GAT2	F : CAGGCACTGGAATTTGTTCA R : TCGATCTTTTAGTCGCAAGAG	(GAT) ₁₀	231	221-239	55	2-DFO	JN165379
Co-AG13	F : GGCGAACTCGTCTGAGTTTCT R : AGAACCACGGTAAGCCCTCT	(AG) ₁₀	138	116-154	55	3-FAM	JN165380
Co-AC5	F : CCTAGTCCGGCATGGATTTA R : TGAATCCTTTAGCTGAAAATGAC	(AC) ₁₀	251	229-261	55	3-FAM	JN165381
Co-CTT15	F : TGAAGATTGACGAGGAGGTG R : TCAGCAACAAGCAGATCCAA	(CTT) ₁₀	154	125-179	55	3-HEX	JN165382
Co-AC4	F : AAGCGAGATTGGCACAACAT R : TCCCTACTGAGAGACCAATCG	(AC) ₁₀	230	203-257	55	3-HEX	JN165383
Co-CT7	F : CTTCTGGCCACGAAAACACT R : CCCAACCAAACTAGTGTCCA	(CT) ₁₀	150	145-167	55	3-DFO	JN165384
Co-AG4	F : CGTCTTTGAATGGCGTCGG R : CTCTCCCTCATCGTCCAG	(AG) ₁₄	235	217-237	55	3-DFO	JN165385

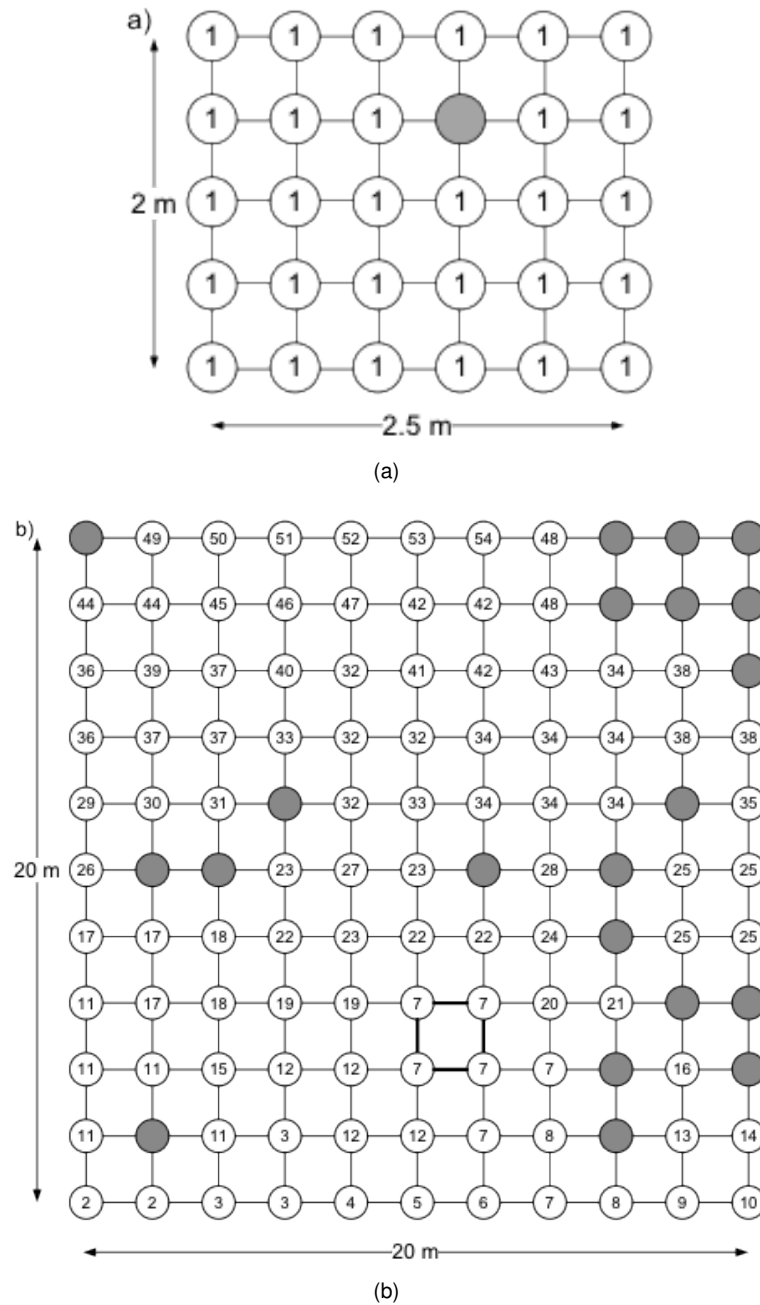


FIGURE 4.1: Sampling scheme and observed genets in (a) Stockem and (b) Vance. In Stockem, the sampling followed a grid of $0.5 \times 0.5\text{m}$ in a quadrat limited to $2.5 \times 2.0\text{m}$. In Vance, the sampling followed a grid of $2.0 \times 2.0\text{m}$ in a quadrat limited to $20 \times 20\text{m}$. Gray circles denote no samples (no available ramet). Bold lines delimit a quadrat of $2.0 \times 2.0\text{m}$ with more detailed sampling (25 samples), where no additional genet was detected. In these two populations, we identified 54 multilocus genotypes (genets) with 20 microsatellite markers (one genet in Stockem and 53 in Vance, respectively).

4.4 Results and discussion

With 1/8th of a Titanium series XLR70 PicoTiter plate, the pyrosequencing produced 24 340 862 bases in 63 860 short fragment reads, i.e. an average size of 191 bp per fragment read. Among those 63 860 reads, 1 170 dinucleotide motifs with a minimum of six repeats and 1 383 trinucleotide motifs with a minimum of four repeats were detected. However, the number of different loci is expected to be lower because the same locus may be found in several reads (also as reverse complement sequence). (AT)_n was the most abundant and common dinucleotide repeat motif we found in *Comarum palustre*, representing 77.69% of total dinucleotide repeats (Table 4.2). This dominance has been also reported for several other plant species by Lagercrantz *et al.* (1993) and Ma *et al.* (1996), based on database searches.

TABLE 4.2: Diversity, number and proportion of dinucleotide and trinucleotide repeat motifs obtained after pyrosequencing (with a minimum number of 6 repeats for dinucleotides and 4 for trinucleotides).

Nucleotide repeat motif type	Repeat motif	Number of observed repeat motifs	Percentage of repeat motifs (%)
Dinucleotide	(AC) _n / (GT) _n	76	6.50
	(AG) _n / (CT) _n	185	15.81
	(AT) _n	909	77.69
Trinucleotide	(AAC) _n / (GTT) _n	116	8.39
	(AAG) _n / (CTT) _n	395	28.56
	(AAT) _n / (ATT) _n	294	21.25
	(ACC) _n / (GGT) _n	103	7.45
	(ACG) _n / (CGT) _n	15	1.09
	(ACT) _n / (AGT) _n	43	3.11
	(AGC) _n / (GCT) _n	69	5.00
	(AGG) _n / (CCT) _n	173	12.51
	(ATC) _n / (GAT) _n	147	10.63
	(CCG) _n / (CGG) _n	28	2.02

Out of the 58 primer pairs tested (comprising 35 dinucleotide and 23 trinucleotide repeats ; Appendix C.1 and Table 4.1), 20 both successfully amplified the target regions and showed quality peaks (9 dinucleotides and 11 trinucleotides ; Table 4.1). We used those microsatellites for further analyses on the samples from two populations (Stockem and Vance).

According to Lawalrée (1961), *C. palustre* has no fixed chromosome number (2n = 28, 42 or 64 depending on the origins). All 20 loci showed a maximum of two alleles per individual, which suggested they were from a diploid genome. We detected only one genet in the Stockem populations (Figure 4.1(a)) while 53 different genets in the Vance population (Figure 4.1(b)). In the small quadrat of 2.0 × 2.0m in Vance, all 25 ramets belonged to the same genet (i.e. genet number 7). The Vance population is an old fen managed by mowing for more than 40 years, whereas the Stockem population is a small population that recently emerged after willows were cut down

4.4. Results and discussion

in 2007, as part of a restoration project (Life05 NAT/B/000088), giving a brand new habitat of wet meadows for colonization by *Comarum palustre*.

In the Vance population, MICRO-CHECKER detected six markers showing signs of a null allele (Table 4.3). We decided to exclude only three markers, basing our decision on their significant excess of homozygotes and the estimated null allele frequencies. However, more than 50% of the alleles at the locus AG-13 were of one allele size class, meaning that binomial analysis could not be performed. We decided to exclude this locus anyway based on the high estimated null allele frequency.

We selected the markers which did not show any sign of null alleles to calculate the mean number of alleles and expected heterozygosity for each locus (Table 4.3). The number of alleles per locus ranged, in Stockem, from 1 to 2 (mean = 1.65) and, in Vance, from 6 to 14 (mean = 9.43) (Table 4.3). The expected heterozygosity, ranging from 0.5964 to 0.8278 with a mean of 0.7421 (Table 4.3), was only calculated for the sampling of Vance since the sampling of Stockem consisted of only one genet. Our preliminary results show a genet size up to 7.2 *m* between two ramets (Figure 4.1(b)).

TABLE 4.3: Results of initial primer screening in two Belgian populations of *Comarum palustre* (Stockem and Vance). For each marker, the number of alleles (A), expected heterozygosity (H_E), observed heterozygosity (H_O), total expected homozygotes (H_{oE}), the total observed homozygotes (H_{oO}), estimated null allele frequencies using Brookfield (r_B) algorithm and combined probability of observed homozygote class frequency for all classes ($P - value$) are given. In bold : loci showing null alleles; In italics : loci showing signs of null alleles but non-significant homozygote excess, and kept for further analyses. The sample size for each population (Stockem and Vance) was 32 and 125, respectively.

	Stockem		Vance							
Marker	A	A	H_E	H_O	$H_E - H_O$	H_{oE}	H_{oO}	r_B	$P - value$	
GAT1	1	9	0.7902	0.6909	0.0993	11.936	17	0.0554	<i>n.s.</i>	
CTT14	2	6	0.7188	0.5926	0.1262	15.546	22	0.0734	<i>n.s.</i>	
CTT2	2	15	0.8529	0.7455	0.1074	8.518	14	0.0579	<i>n.s.</i>	
CTT6	1	10	0.6007	0.6111	-0.0104	21.861	21	-0.0064	/	
CTT9	1	15	0.8004	0.3585	0.4419	10.981	34	0.2454	< 0.001	
CTT11	2	9	0.8052	0.8182	-0.013	11.118	10	-0.0072	<i>n.s.</i>	
CTT10	2	12	0.7087	0.7170	-0.0083	15.792	15	-0.0048	/	
AC1	1	6	0.6851	0.6909	-0.0058	17.663	17	-0.0034	<i>n.s.</i>	
CT4	2	7	0.7153	0.7455	-0.0302	16.018	14	-0.0176	<i>n.s.</i>	
AG2	2	11	0.8070	0.8519	-0.0449	10.824	8	-0.0248	<i>n.s.</i>	
CTT12	2	12	0.7675	0.7818	-0.0143	13.172	12	-0.0081	<i>n.s.</i>	
CTT8	2	14	0.8266	0.7963	0.0303	9.777	11	0.0165	<i>n.s.</i>	
CT8	2	8	0.8171	0.6481	0.169	10.287	19	0.0930	< 0.025	
GAT2	1	6	0.5519	0.4444	0.1075	24.472	30	0.0692	/	
AG13	1	7	0.4497	0.2545	0.1952	30.49	41	0.1346	/	
CTT15	2	11	0.8405	0.8000	0.0405	9.19	11	0.0220	<i>n.s.</i>	
CT7	2	7	0.7346	0.7273	0.0073	14.963	15	0.0042	<i>n.s.</i>	
AC5	2	8	0.7293	0.6727	0.0566	15.254	18	0.0327	<i>n.s.</i>	
AC4	1	7	0.7748	0.7273	0.0475	12.772	15	0.0267	<i>n.s.</i>	
AG4	2	11	0.8647	0.8727	-0.008	7.872	7	-0.0042	<i>n.s.</i>	

4.5 Conclusions

The number of developed microsatellite markers and their observed polymorphism is high enough to allow further population analyses of genetic structure. All these markers can be used in studies of gene flow through paternity inference, clonal growth pattern, and outcrossing rate estimation. Overall, we have shown that 454 pyrosequencing is fast and cost effective method, which may be useful in development of microsatellite markers in many plant species.

4.6 Acknowledgments

The research was funded by the Belgian Fund for Scientific Research (FNRS grant 2.4540.09). L. Somme is a FRIA fellow (Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture). We thank the « Département de la

4.6. Acknowledgments

Nature et des Forêts » (DNF, Région Wallonne, Belgium) for the derogation concerning the sampling of leaves and individuals in the nature reserves, and the DNF and Natagora for granting access to their properties, Guy Colling (Museum national d'Histoire naturelle, Luxembourg) for sending samples, Christel Buyens for technical assistance in the lab and Marie-Christine Flamand (ISV) who ran the samples on the sequencer.

Chapitre 5

Influence of spatial distribution and size of clones on the realized outcrossing rate of the marsh cinquefoil (*Comarum palustre*)¹

5.1 Abstract

Clonal growth is a common feature in flowering plants. As clone size increases, the selfing rate in self-compatible species is likely to increase due to more frequent geitonogamy events (i.e. pollination among flowers within the same genet). This study investigated the breeding system of the marsh cinquefoil (*Comarum palustre*) and assessed spatial distribution of clones, clone size and architecture, and their effects on realized outcrossing rates. In addition, pollen dispersal was investigated in two patchy populations. The species' breeding system was investigated under controlled conditions through hand pollinations (self- versus cross-pollination). Using microsatellite markers, an assessment was made of the realized outcrossing rates and the genetic diversity in four natural populations, the clonal structure in two populations within two populations in five $15 \times 15m$ sampling plots following $0.5 \times 0.5m$ grids, and the pollen dispersal through paternity assignment tests in those two populations. *Comarum palustre* is a self-compatible species but only pre-

1. Somme, L., Mayer, C., Raspé, O., and Jacquemart, A.L. Annals of Botany 2013; doi : 10.1093/aobmct280

sents a low rate of spontaneous self-pollination. We did not detect the occurrence of inbreeding depression at seed set stage ($\delta_{SS} = 0.04$). Clones were spatially clumped ($A_C = 0.60 - 0.80$), with intermediate to no intermingling of the ramets ($D_C = 0.40 - 1.00$). Genet size ranged from one to 171 ramets. Patchy populations had low outcrossing rates ($t_m = 0.33 - 0.46$). Large clones showed lower outcrossing rates than small clones. Pollen dispersal mainly occurred within patches as only 1 to 7% of the pollination events occurred between patches distant of more than 25 m. Seedling recruitment events were detected. Genet size together with distances between patches, through increasing geitono-pollination events, appeared to be important factors influencing realized outcrossing rates. Our study also revealed seed flow allowing seedling recruitment, which may contribute to increase the number of new patches, and potentially further enhance gene flow within populations.

5.2 Introduction

A majority of flowering plant species propagate both by vegetative clonal multiplication and sexual reproduction (Widén *et al.* 1994 ; Klimeš *et al.* 1997 ; Rautiainen *et al.* 2004). Clonal growth through the development of vegetative structures such as rhizomes increases the size of individuals and leads to spatial clusters of genetically identical, yet morphologically independent flowering shoots (ramets) originating from a single individual (genet ; Klimeš *et al.* 1997 ; Charpentier 2001 ; Vallejo-Marín *et al.* 2010). Clonal growth influences the spatial arrangement of ramets within a genet, which is referred to as clonal architecture (Klimeš *et al.* 1997). It is often classified into two extreme propagation strategies. On the one hand, the « phalanx type » is characterized by short internodes and densely clumped ramets, leading to large monoclinal patches. On the contrary, the « guerilla type » presents long internodes and widely dispersed ramets leading to an intermingling of genets (Lovett-Doust 1981).

Clonal growth confers several advantages to a genet, including attractiveness to pollinators by aggregated floral display, increased persistence when sexual recruitment fails and the ability to explore for resources in heterogeneous environments (Wilcock & Neiland 2002 ; Honnay & Bossuyt 2005 ; Louâpre *et al.* 2012). However, when pollen is dispersed over short distances, clonal growth and clonal architecture can negatively affect mating opportunities (Charpentier 2001 ; Albert *et al.* 2008). Restricted pollen dispersal usually results from short movements of pollinators, preferentially foraging among near-neighbour flowers (Williams 2007 ; Fontaine *et al.* 2008 ; Karron *et al.* 2009). The flowering ramets of large, spatially clumped genets may therefore face increased levels of geitono-pollination, i.e. pollination among flowers within the same genet. Particularly, ramets situated within large clumped clones face high levels of geitono-pollination (Honnay & Jacquemyn 2008 ; Albert *et al.* 2008).

Reduced connectivity due to low pollen dispersal between spatially isolated patches of clones within populations with a subsequent low number of genotypes involved in seed production might further reduce the outcrossing rate (Schmucki & de Blois 2009). Geitono-pollination coupled with low mate diversity might induce reproductive costs. In self-compatible plant species, geitono-pollination will increase the selfing rate (Barrett 1998 ; Eckert 2000). If the species suffers from inbreeding depression, geitono-pollination can lead to a reduction in reproductive success (e.g. seed set ; Albert *et al.* 2008). In self-incompatible species, geitono-pollination might induce stigma clogging with self pollen, preventing deposition and germination of compatible outcross pollen (Wilcock & Neiland 2002 ; Honnay & Bossuyt 2005 ; Vandepitte *et al.* 2010).

In this study, we investigated the breeding system and estimated the mating system of the marsh cinquefoil *Comarum palustre* (Rosaceae). This pioneer species occurs in wet meadows and peat bogs across Europe (Macek & Lepš 2007 ; Sarneel *et al.* 2011 ; Sarneel & Soons 2012). These biotopes are particularly threatened, with a subsequent decline of plant species occurring therein (Frankard *et al.* 1998 ; Lammers *et al.* 2002). The species reproduces sexually but also propagates clonally via long lignifying rhizomes (Olesen & Warncke 1992 ; Macek & Lepš 2007). Plants grow sympodially with a terminal inflorescence. If not flowering, the annual increments are separated by short internodes and reduced leaves. The oldest parts of the rhizome may decay, resulting in clone splitting and subsequent independence of ramets (Macek & Lepš 2007). The main pollinators of *C. palustre* are bumble bees and solitary bees (Olesen & Warncke 1992 ; Guillén *et al.* 2005 ; Chapitre 2). The protandrous flowers last for about five days, where the female phase follows the male phase two days after anthesis (Olesen & Warncke 1992).

Assessing asexual propagation and sexual reproductive success within and among the remaining threatened populations, as well as species' dispersal abilities by means of pollen and seed flow, is crucial to design appropriate management plans for long-term persistence of the species. Indeed, conservation strategies usually aim at enhancing connectivity among populations through increased pollen and/or seed flow (Tischendorf *et al.* 2003 ; Kindlmann & Burel 2008), by restoring large biotope areas favouring plant dispersal and establishment, as well as plant pollinator movements. When it is not possible to restore large continuous plant populations, management of conspecific patches among populations might serve as guiding bridges for pollinators from one patch to another and thus act as stepping-stones (Beier & Noss 1998 ; Van Rossum & Triest 2012).

We investigated the breeding system of *C. palustre* by performing hand pollinations under controlled conditions to estimate the species self-fertility, self-compatibility and inbreeding depression at seed set stage. We also assessed clonal growth and clone architecture in two patchy populations using microsatellite markers. To esti-

mate the mating system under natural conditions, we investigated the realized outcrossing rate in four natural populations. We linked the spatial distribution of clones within populations, clone architecture and size to the realized outcrossing rate and effective gene flow, inferred by paternity assignment tests.

Specifically, we addressed the following questions :

1. Is *Comarum palustre* self-compatible and does it suffer from inbreeding depression ?
2. What is the clonal structure of *C. palustre* in natural populations ?
3. At the population level, does the distribution of clones influence the realized outcrossing rate ?
4. At a fine scale, do clone architecture and size influence the realized outcrossing rate ?
5. How far does pollen dispersal occur between patches in patchy populations ?

As some of the study populations are managed through extensive cattle grazing, we discussed our findings in the light of this management practice.

5.3 Methods

5.3.1 Breeding system under controlled conditions

In May 2009, the breeding system was assessed on flowering shoots of 45 genets of *Comarum palustre* planted in 5-L pots (one plant per pot) filled with compost. The genets originated from two natural Belgian populations, Regné (50°14'32.57"N, 5°46'51.49"E) and Fouches (49°41'14.59"N, 5°43'6.75"E), separated from each other by 65 km. The genets were kept in open greenhouse until being transferred just before flowering under controlled conditions in growth chambers at the Université catholique de Louvain (Louvain-la-Neuve, 50°39'58"N, 4°37'9"E). Light was supplied by Philips HPIT 400-W lamps (Philips Lighting, Brussels). Temperature was kept at 20/17°C ± 3°C (day/night) and relative humidity at 65 ± 12% with a day/night cycle of 16/8h. Plants were watered with rainwater three times a week. Four flowers at the female stage were selected per flowering ramet (45 ramets per treatment) and randomly assigned to the following treatments : (i) hand cross-pollination (CP), with pollen transfer from a male-phase flower to a female-phase flower from another individual, (ii) hand geitonogamy-pollination (GP), with pollen transfer from a male-phase flower to a female-phase flower of a same individual, (iii) hand self-pollination (SP), with pollen transfer from the stamens of a flower at male-phase to the stigma of the same flower at female-phase, and (iv) spontaneous self-pollination (SSP) with unmanipulated flowers.

5.3. Methods

Fruits, consisting of a dry aggregate of achenes on an accrescent spongy receptacle (Olesen and Warncke 1992), were harvested three weeks later and stored in individual envelopes at room temperature before achene counting. Seeds were scanned at 600 dpi and counted using a macro created with ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). They were automatically sorted into three categories according to size and shape : plump achenes, partly filled achenes and unfertilized ovules. The morphological screening was confirmed by testing seed viability (Kearns & Inouye 1993). Seeds were longitudinally cut and soaked in a 1% 2,3,5-triphenil-tetrazolium chloride solution for 24h at 35 °C. The colorimetric test showed that 90% of the plump seeds were viable and 97% of the partly filled seeds were aborted. Fertilization rate was calculated as the ratio between the number of viable plus aborted seeds and total number of ovules. Seed set was calculated as the ratio between the number of viable seeds and total number of ovules.

Seed set data from the hand pollination treatments were used to estimate the self-fertility index (SFI) and inbreeding depression at seed set stage (δ_{SS}). SFI gives an estimate of the capacity of a plant to produce fruits and seeds in the absence of pollen vectors. It is calculated as the seed set of spontaneous self-pollination relative to that of hand cross-pollination (Lloyd & Schoen 1992). Inbreeding depression (δ_{SS}), the reduced fitness of progeny derived from inbreeding relative to outbreeding, was estimated at the seed set stage as : $\delta_{SS} = 1 - w_s/w_0$, where w_s and w_0 are, respectively, the mean seed set following geitono- and cross-pollination (Husband & Schemske 1995).

5.3.2 Study sites for genetic analyses

The realized outcrossing rate was assessed in four natural populations of *Comarum palustre* in South Belgium (Table 5.1). The study site located in Bihain (50°14'25.89"N, 5°48'22.60"E) consisted of a wet meadow used as an extensive pasture and displayed a continuous population of *C. palustre* covering 2700 m². The population located in Sainte-Marie (49°40'3.31"N, 5°32'56.81"E) consisted of floating mats of *C. palustre* on 250 m², intermingling with willow thickets. The study site located in Fosse (50°15'45.77"N, 5°38'37.44"E) displayed 6 patches of *C. palustre* separated from each other by 25 to 210 m, summing up to a total population size of 600 m². This study site was managed through extensive cattle grazing. The study site located in Bra (50°19'5.51"N, 5°44'35.54"E) displayed 3 patches of *C. palustre* being separated from each other by 52 to 100 m, summing up to a total population size of 1450 m². This study site was also managed through extensive cattle grazing. The two latter sites (i.e. Fosse and Bra) were studied for fine-scale clonal structure and pollen dispersal inferred by paternity assignment tests.

Flower density, defined as the number of open flowers recorded on 15 plots of

TABLE 5.1: Characteristics of four Belgian study populations of *Comarum palustre* : geographic coordinates, population area (i.e., area covered by *C. palustre* individuals), mean flower density, number of sampled ramets (N), number of multilocus genotypes (G), clonal richness ($R = (G - 1) / ((N - 1))$), number of sampled maternal ramets (N_m) and number of seedlings used to estimate the realized outcrossing rate (N_S).

Population	Coordinates		Population area (m^2)	Flower density (flowers. m^{-2})	N	G	R	N_m	N_S
	Latitude (N)	Longitude (E)							
Bihain	50°14'25.89"	5°48'22.60"	2500	18.5 ± 9.1	16	13	0.80	16	128
Sainte-Marie	49°40'3.31"	5°32'56.81"	250	23.0 ± 10.8	11	9	0.80	11	88
Bra	50°19'5.51"	5°44'35.54"	1450	55.8 ± 35.7	737	21	0.03	14	112
Fosse	50°15'45.77"	5°38'37.44"	600	59.9 ± 25.5	480	22	0.04	17	136

1 m^2 randomly chosen per population, was significantly different among the four populations, with Bra and Fosse displaying higher flower density (56-60 flowers m^{-2}) than Bihain and Sainte-Marie (19-23 flowers m^{-2} ; $\chi^2 = 29.76$, $d.f. = 3$, $P < 0.001$; Table 5.1).

5.3.3 Sampling for genetic analyses

In July 2011, we randomly collected one young leaf and one fruit from 25 ramets per population in the four populations to estimate the effect of spatial distribution of ramets on the realized outcrossing rate at the population level. In order to investigate the effect of clonal structure and clone size on fruit realized outcrossing rate, we collected one fresh leaf per ramet at each node of a $0.5 \times 0.5m$ grid within two and three $15 \times 15m$ plots in the patchy populations of Fosse and Bra, respectively (Figure 5.1; Arnaud-Haond *et al.* 2007).

In order to be confident that full sampling of the potential paternal plants was achieved for the paternity assignment tests in the two patchy populations, the sampling was extended to the entire population. It resulted in a sampling of 480 and 737 ramets in Fosse and Bra, respectively.

A total of 50 plump achenes were selected per fruit for germination. The germination procedure was adapted from Whittington *et al.* (1988), Baskin & Baskin (1990), and Lyanguzova (2011). Seeds were scarified with sand paper (3M 255P) and soaked in GA_3 ($3.5 mg.L^{-1}$) for 2 h before sterilisation in 500 ml of BRAVO fungicide (0.01%, Syngenta, Basel, Switzerland) for about 30 sec . Batches of 10 achenes per fruit were sown on moist filter paper in five Petri dishes (a total of 500 Petri dishes) and placed in germination chambers (Snijders, Netherlands; 12- h day length and 12/12 h alternating temperature regimes of 15/25 °C). After ten weeks, each seedling weighing ca. 25 mg was individually stored at -80 °C until DNA isolation.

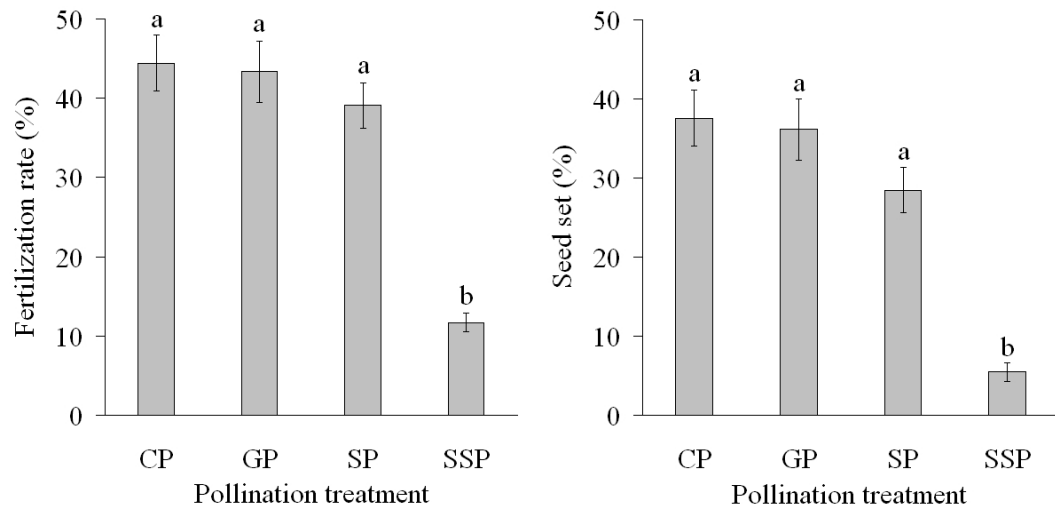


FIGURE 5.1: Mean fertilization rate and seed set (% $\pm$ SE) for the pollination treatments performed under controlled conditions : hand cross-pollination (CP), hand geitono-pollination (GP), hand self-pollination (SP) and spontaneous self-pollination (SSP). Group means that were significantly different ($P < 0.05$) are indicated with different letters.

5.3.4 DNA extraction and microsatellite genotyping

We extracted DNA from 75 *mg* of leaf tissue and of 25 *mg* seedlings using the CTAB method (Doyle & Doyle 1990) and standardized DNA extracts to a concentration of 5 *ng*. μ L⁻¹. Among the sampled fruits, we selected those that provided a minimum of 8 seedlings which allowed for a sufficient number of maternal ramets for a correct estimation of the realized outcrossing rate at the population level (Table 5.1). We used 16 of the 20 polymorphic microsatellite markers previously developed (Somme *et al.* 2012). The laboratory protocols were the same as those described in Somme *et al.* (2012). Subsequently, we electrophoresed the PCR products on an ABI3100 capillary sequencer with GS400HD size standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyzed the electropherograms using GeneMapper version 3.7 (Applied Biosystems).

5.3.5 Genetic diversity and clonal structure

To discriminate between ramets that might represent identical genets resulting either from sexual reproduction events or clonal propagation, the probability of the first re-encounter ($n = 1$) of identical genets via sexual reproduction P_{sex} (Parks & Werth 1993) for each genet was calculated among the four populations using GEN-CLONE 2.0. (Arnaud-Haond & Belkhir 2007). To ascertain the uniqueness of genets with missing data (i.e. unamplified loci), these genets were examined separately after

removing the missing loci from the entire dataset. It further allowed estimating genet size (N_R) among populations (i.e. the number of ramets per genet).

After clone identification, clonal diversity was assessed among the four populations by the genotypic richness R , computed as $R = (G - 1)/(N - 1)$, where G is the number of identified genets, and N the number of sampled ramets within each population (Dorken & Eckert 2001).

For the assessment of population genetic measures, multiple ramets with identical genets were reduced into a single genet (Table 5.1 ; Table 5.2). For the four populations, the average number of alleles per locus (N_A), the expected and observed heterozygosity (H_E and H_O , respectively) and the Weir & Cockerham (1984)'s inbreeding coefficient (F_{IS}) were calculated separately for adult plants and offspring using GENETIX 4.05.2 (Montpellier University, France). The H_E values were corrected for small sampling size for adult plants, by applying the $2N/(2N - 1)$ correction. The significance of the F-statistics was tested at the 95% confidence interval (CI) with 1 000 permutations and the mean F-statistics were considered significant when confidence intervals did not overlap zero.

Spatial clone architecture and clonal structure were estimated among the five $15 \times 15m$ sampling plots in the two patchy populations of Fosse and Bra by calculation of the aggregation index A_C at the patch level and of the clonal dominance index D_C for each genet. The aggregation index A_C was calculated using GENCLONE 2.0. (Arnaud-Haond & Belkhir 2007) as $A_C = (p_{sg} - p_{sp})/p_{sg}$, where p_{sg} is the average probability of clonal identity of all sample unit pairs, and p_{sp} the average probability of clonal identity among pairwise nearest neighbours. The significance of A_C was tested with 10 000 permutations. To determine the level of intermingling between genets, the clonal dominance index D_C was calculated for each genet as $D_C = (N_R - 1)/(N_T - 1)$, where N_R is the genet size (i.e. the number of ramets per genet) and N_T the total number of ramets present within the genet range (i.e. within the minimal polygon containing all ramets of the given genet ; Ohsako 2010). A clonal dominance index of 1 indicates that the spatial range of a genet is occupied exclusively by ramets of the same genet. Only genets representing more than two ramets were subjected to calculation of clonal dominance.

5.3.6 Outcrossing rates

To estimate the realized outcrossing rate, i.e. outcrossing rate that produce viable seeds, in the study populations, the genotypes of the maternal ramets and their offspring were analysed with MLTR 3.3 (Ritland 2002). Default initial values of the parameters were used (i.e. $t = 0.9$, $r_t = 0.1$, $r_p = 0.1$, $F = 0.1$). We used 1 000 bootstraps to derive confidence intervals with resampling performed over families. On the basis of maximum likelihood procedures, the program estimates the single- and multi-locus

5.3. Methods

outcrossing rates (t_s and t_m , respectively), biparental inbreeding ($t_m - t_s$), singlelocus maternal inbreeding coefficient (F), correlated selfing rate (r_s) and the multilocus paternity correlation (r_p ; Ritland 2002). The multilocus paternity correlation is the proportion of full-sibs among outcrossed sibs and indicates whether offspring are the result of single or multiple paternities. The reciprocal of r_p ($N_{ep} = 1/r_p$) gives the effective number of pollen donors (Ritland 2002).

5.3.7 Paternity analysis

A paternity analysis was carried out for the populations of Fosse and Bra. Paternity was assigned on a total of 112 and 136 seedlings from 17 and 14 fruits (i.e. 8 seedlings per fruit), respectively, using CERVUS 3.0 (Marshall *et al.* 1998; Kalinowski & Taper 2006). All potential parent genets within populations (22 and 21, respectively) were included in the analysis. CERVUS implements a likelihood-based assignment method using the allelic frequencies from the population, the number of candidate paternal plants, the proportion of paternal plants that are sampled, as well as possible errors in the genetic data (Marshall *et al.* 1998). For the simulations, we used the allelic frequencies computed on the parental population and applied the following simulation parameters to find the confidence level of paternity analysis assignment : 10 000 simulated mating events ; 22 and 21 candidate paternal plants, respectively ; 16 as the minimum number of loci ; 0.90 as the proportion of candidate parents sampled ; 0.05 as the genotyping error rate ; all adult plants treated as candidate paternal plants. The relaxed and strict confidence levels (CL), which corresponded to the statistical confidence of the assignments, were set to 80% and 95%, respectively. We only considered fully genotyped offspring (at 16 loci) that presented no more than one mismatch to the maternal plant. A total of seven paternity assignments with more than two mismatches in the final trio mother / father / offspring were discarded.

5.3.8 Statistical analyses

We used Kruskal-Wallis and Mann-Whitney-U tests to compare fertilization rate (i.e. ratio between the number of viable plus aborted achenes and total number of ovules) and seed set (i.e. ratio between the number of viable achenes and total number of ovules) per fruit from the different pollination treatments performed under controlled conditions.

To assess any effect of spatial distribution of clones (continuous or patchy) on the outcrossing rate, we performed Mann-Whitney-U tests with the multilocus outcrossing rate from the four populations. Within the two patchy populations, intercorrelation between the multilocus outcrossing rate within the $15 \times 15m$ sampling plots and

genet size (N_R) was tested using Kendall correlation analyses. We used Kruskal-Wallis tests to compare the expected and observed heterozygosities, and Weir and Cockerham (1984)'s inbreeding coefficient of the offspring and the adults. If not indicated otherwise, data are presented as mean $\pm$ standard deviation. All analyses were performed with R 2.13.0 (R Development Core Team 2012).

5.4 Results

5.4.1 Breeding system

Hand pollinations performed under controlled conditions led to significant differences in fertilization rate and seed set ($\chi^2 = 62.56 - 76.23$, $d.f. = 3$, $P < 0.001$; Figure 5.1). Hand cross-, self- and geitono-pollination led to a higher fertilization rate and seed set than spontaneous self-pollination ($Z = 407 - 621$, $P < 0.001$). Consequently, *Comarum palustre* showed a low SFI (0.15), as flowers left to spontaneous self-pollination led to a low mean seed set (5.5 ± 4.1) compared to hand cross-pollinated flowers (37.6 ± 3.5 ; $Z = 504$, $P < 0.001$; Figure 5.1).

Pollen origin, i.e. cross vs. self pollen, had no significant effect on the seed set, which did not significantly differ among the different hand pollination treatments ($Z = 986 - 1392$, $P > 0.05$; Figure 5.1). The inbreeding depression estimate at the seed set stage was low, with $\delta_{SS} = 0.04$.

5.4.2 Genetic diversity and clonal structure

Among the four populations, the number of genets ranged from 9 in Sainte-Marie to 22 in Fosse (Table 5.1). All ramets within genets in the four populations were associated with a P_{sex} value $< 10^{-9}$. The genotypic richness R ranged from 0.03 in Bra to 0.80 in Sainte-Marie and Bihain (Table 5.1).

Potential parental plants genotyped at 16 loci showed moderate to high expected and observed heterozygosity ($H_E = 0.65 - 0.74$; $H_O = 0.59 - 0.75$; $Z = 83 - 11$, $P > 0.05$), and low inbreeding coefficient values ($F_{IS} = -0.03 - 0.05$; Table 5.2), except for the population of Fosse, which showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($F_{IS} = 0.09$; Table 5.2). In the patchy populations of Bra and Fosse, the offspring showed high expected heterozygosity ($H_E = 0.52 - 0.60$), but low observed heterozygosity ($H_O = 0.33 - 0.39$; $Z = 28 - 58$, $P < 0.01$) and high inbreeding coefficient values ($F_{IS} = 0.37 - 0.38$; Table 5.2). In the non-patchy populations of Bihain and Sainte-Marie, the offspring showed both high expected and observed heterozygosity ($H_E = 0.70 - 0.72$; $H_O = 0.61 - 0.66$; $Z = 60 - 101$, $P < 0.05$) and low inbreeding coefficient values ($F_{IS} = 0.07 - 0.14$; Table 5.2). The H_O and F_{IS}

5.4. Results

values were significantly lower for the offspring than for the adults in the two patchy populations ($Z = 22 - 28$, $P < 0.001$; $Z = 15 - 27$, $P < 0.001$, respectively).

TABLE 5.2: Genetic diversity measures for *Comarum palustre* in four study populations. For each population, the mean number of alleles (N_A), expected heterozygosity (H_E), observed heterozygosity (H_O) and Weir & Cockerham's inbreeding coefficient (F_{IS}) are shown for adult plants and offspring, with standard error between brackets. The 95% confidence intervals are given between brackets for the Weir & Cockerham's inbreeding coefficient (F_{IS}). Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium of F_{IS} values are in *italic*. For the analyses, multiple ramets with identical genet were reduced into a single genet.

		N_A	H_E	H_O	F_{IS}
Bihain	Adults	6.8 (0.6)	0.74 (0.15)	0.75 (0.22)	-0.01 (-0.10, 0.05)
	Offspring	8.9 (0.7)	0.72 (0.14)	0.61 (0.13)	0.14 (0.10, 0.21)
Sainte-Marie	Adults	5.2 (0.5)	0.72 (0.13)	0.72 (0.21)	-0.03 (-0.17, 0.11)
	Offspring	6.8 (0.5)	0.70 (0.10)	0.66 (0.11)	0.07 (0.02, 0.12)
Bra	Adults	6.6 (0.7)	0.69 (0.04)	0.64 (0.04)	0.05 (-0.05, 0.11)
	Offspring	5.1 (0.4)	0.52 (0.05)	0.33 (0.04)	0.38 (0.31, 0.44)
Fosse	Adults	6.0 (0.5)	0.65 (0.03)	0.59 (0.04)	0.09 (0.01, 0.17)
	Offspring	6.0 (0.4)	0.60 (0.04)	0.39 (0.03)	0.37 (0.32, 0.40)

Analysis of the clonal structure in the patchy populations of Bra and Fosse revealed a number of genets within the five $15 \times 15m$ sampling plots ranging from 2 in patch P1 to 8 in patch P4 (Figure 5.3; Table 5.3). Among these sampling plots, the estimated aggregation index (A_C) ranged from 0.60 in patch P3 to 0.80 in patch P2 ($P < 0.001$), indicating significant spatial clustering of clonal ramets. The mean clonal dominance index ranged from 0.76 in patch P4 ($D_C = 0.54 - 0.92$) to 1.00 in the four other patches (Table 5.3; Figure 5.3), indicating that the spatial range of a genet was almost exclusively occupied by ramets belonging to that genet. Genet size (N_R) within the sampling plots ranged from one to 171 ramets.

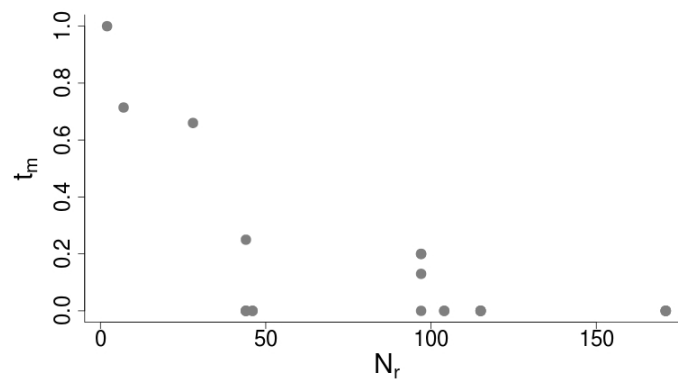


FIGURE 5.2: Relationship between genet size (N_R) and multilocus outcrossing rate (t_m).

TABLE 5.3: Clonal structure of the five $1.5 \times 1.5m$ sampling plots in the populations of Bra and Fosse : number of genotypes (G), clonal richness ($R = (G - 1)/(N - 1)$), aggregation index (A_C), mean clonal dominance index ($\overline{D_C}$), clone identity of the sampled maternal ramets, clone size, genet size (N_R), clonal dominance index (D_C), single- and multi- locus outcrossing rates (t_s and t_m) and biparental inbreeding ($t_m - t_s$). Each row represents a fruit of the same genet.

Sampling plot	Population	G	R	A_C	$\overline{D_C}$	Clone identity	Clone size size (m^2)	N_R	D_C	t_s	t_m	$t_m - t_s$
P1	Bra	2	0.01	0.67	1.00	B1	7.0	28	1.00	0.55	0.66	0.11
						B2	28.8	115	1.00	0.00	0.00	0.00
										0.00	0.00	0.00
										0.00	0.00	0.00
P2	Bra	4	0.02	0.80	1.00	B5	42.8	171	0.99	0.00	0.00	0.00
										0.00	0.00	0.00
										0.00	0.00	0.00
										0.00	0.00	0.00
P3	Bra	5	0.02	0.60	1.00	B10	10.0	44	1.00	0.11	0.25	0.14
										0.00	0.00	0.00
										0.00	0.00	0.00
										0.00	0.00	0.00
P4	Fosse	8	0.04	0.62	0.79	F8	26.8	97	0.74	0.05	0.20	0.15
										0.05	0.20	0.15
										0.00	0.00	0.00
										0.04	0.13	0.09
P5	Fosse	4	0.02	0.64	1.00	F10	11.3	46	0.40	0.00	0.00	0.00
										0.00	0.00	0.00
						F2	25.0	104	1.00	0.00	0.00	0.00
						F3	0.5	2	1.00	0.91	1.00	0.09

5.4. Results

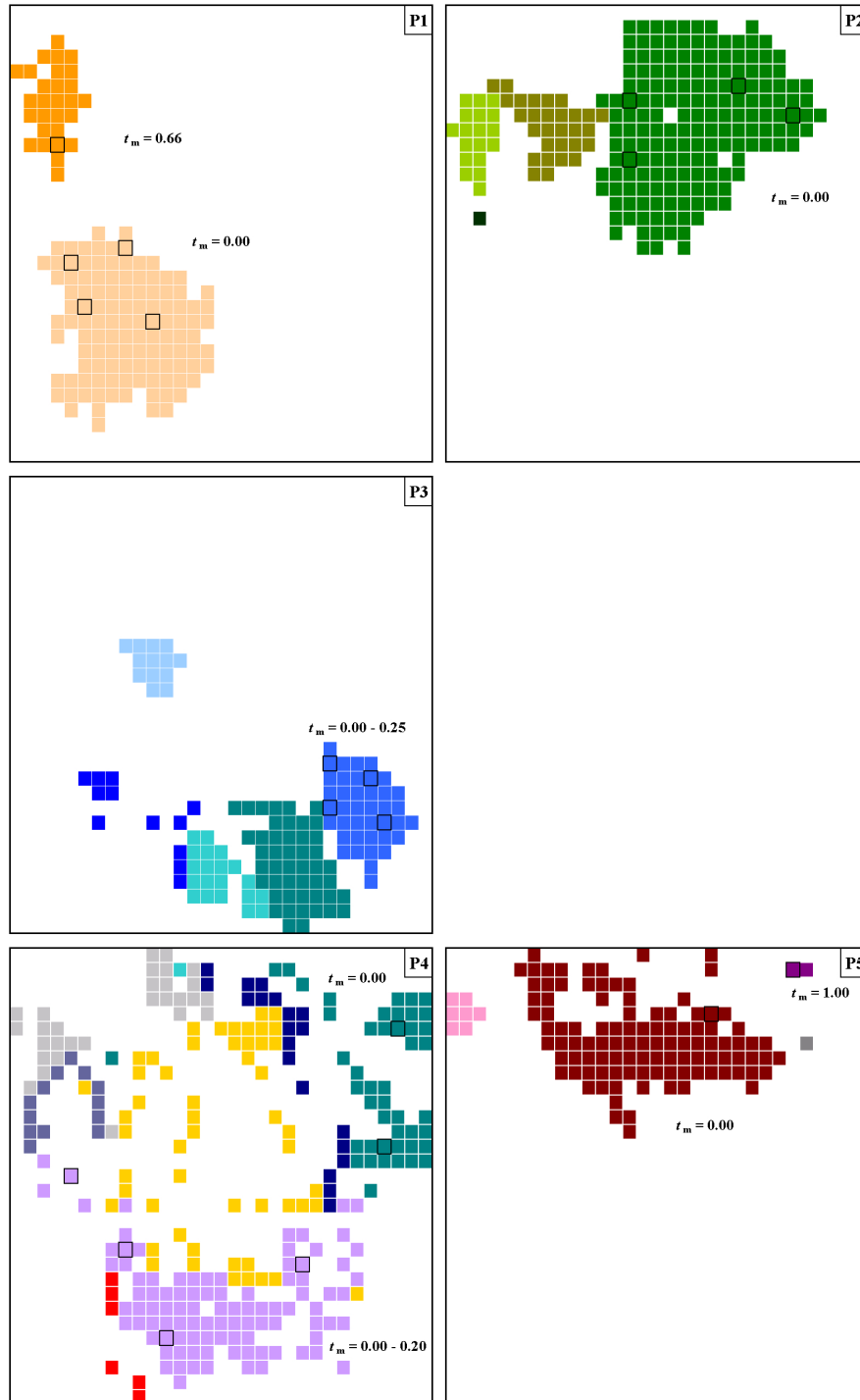


FIGURE 5.3: Spatial distribution of the clones in five sampling plots of *Comarum palustre* : P1, P2, P3 from the population of Bra, and P4, P5 from the population of Fosse. In each plot, samples were collected in a $15 \times 15m$ quadrat at each point of intersection of a $0.5 \times 0.5m$ grid. Samples belonging to the same genet are represented by the same colour. The absence of *C. palustre* individuals is indicated by blank squares. Bold squares indicate sampled fruits for outcrossing rate estimates within clone patches.

5.4.3 Outcrossing rates

At the population level, single- and multi-locus outcrossing rates were highly variable and ranged from 0.14 to 0.79 and from 0.33 to 0.84, respectively (Table 5.4). We found a significant effect of spatial distribution of clones on outcrossing rates, with higher outcrossing rates in the non-patchy populations of Bihain and Sainte-Marie compared to the patchy populations of Bra and Fosse ($Z = 33, P < 0.001$). Within plots, the multilocus outcrossing rate was significantly correlated to genet size (Kendall Rank Correlation, $\tau = -0.54, P < 0.01$) and ranged from 0.00 to 1.00 (Figure 5.2 ; Table 5.3).

TABLE 5.4: Mating system variables ($\pm$ SD) of four Belgian study populations of *Comarum palustre* : single- and multi-locus outcrossing rates (t_m and t_s), biparental inbreeding ($t_m - t_s$), maternal inbreeding (F) correlated selfing rate (r_s), multilocus paternity correlation (r_p) and the number of effective pollen donors ($N_{ep} = 1/r_p$).

Population	t_s	t_m	$t_m - t_s$	F	r_s	r_p	N_{ep}
Bihain	0.75 ± 0.06	0.84 ± 0.09	0.09 ± 0.06	0.02 ± 0.03	0.42 ± 0.42	0.26 ± 0.14	3.86
Sainte-Marie	0.79 ± 0.07	0.83 ± 0.10	0.04 ± 0.08	-0.16 ± 0.06	0.32 ± 0.23	0.49 ± 0.07	2.05
Bra	0.14 ± 0.06	0.33 ± 0.07	0.19 ± 0.06	-0.20 ± 0.02	0.14 ± 0.09	0.88 ± 0.33	1.14
Fosse	0.34 ± 0.05	0.46 ± 0.06	0.12 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.09	0.36 ± 0.10	2.79

Between 4 and 19% of matings occurred between genetically related genets (biparental inbreeding, $t_m - t_s = 0.04 - 0.19$; Table 5.4). Maternal inbreeding coefficients varied among populations ($F = -0.20 - 0.06$; Table 5.4), with negative values in the populations of Bra and Sainte-Marie. The multilocus paternity correlation within fruit was high and ranged from 0.26 to 0.88. Consequently, the effective number of pollen donors (N_{ep}) per fruit ranged from 1.14 to 3.86 (Table 5.4).

5.4.4 Paternity analyses and gene flow

Assignment rate reached 96% in Fosse and 98% in Bra. While 97 and 88 offspring in Bra were assigned at the 80% CL and 95% CL, respectively, all of the 127 assigned offspring in Fosse were assigned at the 95% CL.

Paternity assignments revealed that only 1 and 7 % of the analyzed offspring were sired by pollen dispersed between patches in Bra and Fosse, respectively. Nevertheless, some crossing events occurred between patches distant of 90 m in Bra and patches distant of 25 up to 170 m in Fosse. Paternity analyses performed on genets in Bra revealed that achenes originating from patch P1 established in a third patch.

5.5 Discussion

5.5.1 Breeding system

Comarum palustre depends on external agents to transfer pollen from the anthers onto the stigmas as we observed negligible seed set resulting from spontaneous self-pollination under controlled conditions. It might be explained by the protandry of the flowers of *C. palustre*, allowing a temporal separation of male and female stages. Protandrous species usually directly depend on animal pollination to set seeds (Lloyd & Schoen 1992; Routley & Husband 2003).

In this study, we did not observe any significant effect of pollen source on seed set under controlled conditions : flowers receiving outcross pollen showed a similar seed set to those receiving self pollen. It implies that *C. palustre* is a self-compatible species. These results are consistent with a former study performed in a natural population of *C. palustre* in Denmark (Olesen & Warncke 1992). Besides, our results did not support the occurrence of inbreeding depression at seed set stage. However, inbreeding depression has been reported to occur in *C. palustre* (Olesen & Warncke 1992), with higher germination rates of outcrossed than selfed achenes (0.48 and 0.41, respectively). Moreover, in our study, F_{IS} values were found to be higher at adult stage (see below), suggesting selective pressure related to inbreeding depression at early life stages. Further investigation on the effect of the origin of pollen over the entire development cycle of individuals of *C. palustre* under controlled conditions is certainly needed to determine whether this species suffers from inbreeding depression and how it can affect population dynamics.

5.5.2 Clonal structure

Clonal structure analyses by means of the aggregation index revealed that genets were spatially clumped in the patchy populations of Bra and Fosse. The clonal dominance index revealed that genets of *C. palustre* presented a phalanx-type spatial architecture with no or few intermingling of the ramets. Such spatial distribution pattern has been reported to result from a slow radial spread of the ramets, inducing short internodes between ramets (Lovett-Doust 1981). However, clones in one sampling plot showed higher intermingling than in the other plots. Such spatial architecture rather corresponds to a guerrilla-type spatial architecture. It might reflect the foraging or the escape strategy of clonal plant species, which aims to optimize resource acquisition by concentrating ramets in favourable environments (Kroons & Hutchings 1995). Genet size ranged from one to 171 ramets, which corresponded to a genet area of less than 0.5 m^2 to 42.8 m^2 . Similar genet areas have been reported for the clonal pioneer species *Menyanthes trifoliata*, which occurs in similar

biotopes to *C. palustre* (Raabova et al. unpubl.data). The extent of clone persistence and spreading have been reported to be genetically determined (Huber *et al.* 1999 ; Rautiainen *et al.* 2004), and influenced by biotic (e.g. herbivory) and abiotic (e.g. low temperatures, seasonal flooding, resource availability) factors (Stuefer & Huber 1998 ; Huhta *et al.* 2000 ; Lenssen *et al.* 2004 ; Louâpre *et al.* 2012). In particular, Macek & Lepš (2007) demonstrated that growth traits of *C. palustre* (i.e. rhizome length and branching) were positively correlated with surrounding vegetation density and height. As the two patchy populations of Fosse and Bra have been extensively grazed, actual clone size might also have been influenced by cattle trampling, likely leading to rhizome breaking. As a consequence, cattle trampling might further limit clone size (see e.g. Eriksson 1993 ; Austin *et al.* 2007 ; Rosenthal & Lederbogen 2008). Moreover, cattle trampling may increase bare soil area which represents optimal conditions for seed germination and recruitment of pioneer species such as *C. palustre* (Rosenthal *et al.* 2012 ; Sarneel & Soons 2012).

5.5.3 Outcrossing rates

The wide range of realized outcrossing rates observed for all four populations further support the self-compatibility of *C. palustre*. Our findings highlighted the influence of the spatial distribution of clones and genet size (i.e. the number of ramets) at the population level on the realized outcrossing rate : patchy populations and large clones showed low outcrossing rates. Besides, paternity assignment tests revealed that most of the gene flow occurred within patches. Patchy populations are commonly expected to present low levels of gene flow between patches with a subsequent low number of genotypes involved in seed production within patches (Ellstrand & Elam 1993 ; Young *et al.* 1996 ; Sork *et al.* 1999). Indeed, a patchy distribution of ramets may influence insect foraging behaviour. Especially bumble bees and solitary bees, which are known to be pollinators of *C. palustre* in the study regions (Chapitre 2) preferentially forage among near-neighbour flowers (Chittka *et al.* 1997 ; Karron *et al.* 2009) and tend to stay longer within patches, consequently reducing pollen dispersal distances (Kwak *et al.* 1998 ; Goverde *et al.* 2002). In self-compatible species, short-distance pollen dispersal may favour geitono-pollination, especially when genet size is large, inducing low outcrossing rates due to self pollen deposition and germination or stigma clogging, whereas small clones receive more immigrant pollen flow from large clones. This might reflect preferential pollen flow originating from large clones, as found for *Convallaria majalis* (Vandepitte *et al.* 2013). Moreover, the two patchy populations are characterized by high flower densities. As bumble bees are known to preferentially forage sequentially near-neighbour flowers, high flower density patches may induce self pollen deposition by pollinators, which further favour low outcrossing rates (Karron *et al.* 2003 ; Raspé *et al.* 2004).

5.6. Implications for conservation

Low outcrossing rate within patches resulted in higher proportions of homozygotes among the offspring ($H_O = 0.33 - 0.39$) compared to the adults ($H_O = 0.59 - 0.64$) and so in highly inbred progeny ($F_{IS} = 0.37 - 0.38$) compared to the adults ($F_{IS} = 0.05 - 0.09$). Selective pressure throughout life stages might be involved in this pattern as it may favour outcrossed offspring of *C. palustre*. Indeed, Olesen & Warncke (1992) reported inbreeding depression acting on seedling germination, while Sarneel & Soons (2012) reported negative selective pressure on seedlings at high density. Therefore we may hypothesize that at recruitment and later life stages, offspring resulting from cross-pollination might be favoured to those resulting from self-pollination, especially under physiological stress or competition (see e.g. Price & Waser 1979 ; Waller 1984).

5.5.4 Pollen dispersal

We detected little realized gene flow among patches. Long distances pollinator movements between patches may increase the likelihood of foraging on other plant species and thus induce pollen loss or increase deposition of heterospecific pollen (Kwak *et al.* 1998). However, these long distance movements are essential to maintain genetic diversity through gene flow within but also between populations (Hardy *et al.* 2004 ; Buehler *et al.* 2012), and stepping-stone patches are usually considered to increase the population connectivity by guiding pollinators at low energetic cost from one patch to another, enhancing pollen dispersal (Kwak *et al.* 1998 ; Van Rossum & Triest 2012). In the patchy population of Fosse, patches distant from 25 to 70 *m* may act as stepping-stones and contribute to increase pollen transfer, therefore favouring dispersal distances up to 170 *m*. This population consequently showed similar pollen dispersal distances to those reported in other populations of *C. palustre* with fluorescent dye used as pollen analogue (Mayer *et al.* 2012b). Though Mayer *et al.* (2012b) already showed that bumble bees flew through the entire population by using fluorescent dye to mimic pollen, we further demonstrated that long-distance and between-patches pollinator movements might lead to effective pollination and pollen flow, also followed by seedling recruitment.

5.6 Implications for conservation

To ensure connectivity by pollen and seed flow within patchy populations in a context of habitat fragmentation, it is essential to characterize species response to habitat fragmentation in relation to life-history traits such as the mating system and dispersal abilities (Charpentier 2001 ; Aguilar *et al.* 2006). Our findings showed that

1. pollinators play an essential role in pollen transfer for the protandrous flowers of *C. palustre* ;
2. the species is self-compatible and inbreeding depression at seed set stage was not detected, though negative selective pressure on selfed progenies is likely to occur ;
3. the clonal structure (i.e. genet size, aggregation and distance between patches) plays a significant role on the quality of pollen transfer and on population genetic diversity ;
4. short-distance dispersal events are more frequent than long-distance dispersal events within patchy populations.

These factors need to be taken into account in management strategies for ensuring population persistence. First, ensuring pollen flow between clone patches within plant populations may contribute to increase the outcrossing rate and then favour high genetic diversity, whereas high selfing rate may lead to low seedling survival and impoverished genetic diversity. As pollen flow between clone patches occurs by means of pollinators, especially bumble bees, management practices at the population and landscape level should further favour habitats suitable for these pollinators (Moroñ *et al.* 2008 ; Chapitre 2). Second, clonal structure within populations may be a key feature in the restoration or maintenance of efficient pollen dispersal. Clonal structure might be improved by management practices, such as mowing, topsoil removal and extensive cattle grazing. They are usually applied to restore wet meadows, fens and bogs or maintain these habitats at early succession stages, and favour pioneer plant species such as *C. palustre* (Middleton *et al.* 2006a ; Metsoja *et al.* 2012), and thus deserve attention. For instance, favouring the occurrence of bare soil areas might increase potential suitable conditions for seedling recruitment of *C. palustre* (Sarneel & Soons 2012). Finally beside pollen dispersal, seed dispersal between patches, and subsequent seedling establishment, might increase the abundance of stepping-stone patches, the gene dispersal and further increase genetic diversity.

5.7 Acknowledgments

The authors thank the Belgian Fund for Scientific Research (FNRS contract 2.4540.09) for funding this research. L. Somme holds a FRIA fellowship (Funds for training in Industry and Agriculture Research). The study was conducted in accordance with current Belgian laws. We thank the « Département de la Nature et des Forêts » (DNF, Région Wallonne, Belgium) for the derogation concerning the sampling of plant individuals in nature reserves, and the DNF and Natagora for granting access to their properties. We thank Christel Buyens, Marc Migon, Marie-Christine Eloy and Marie-Christine Flamand for technical assistance, Xavier Draye for development of the ma-

5.7. Acknowledgments

cro for ImageJ, and Fabienne Van Rossum and anonymous referees for improving the manuscript.

Chapitre 6

Discussion

6.1 La communauté des insectes pollinisateurs

6.1.1 Impact de la fragmentation sur la communauté des pollinisateurs

L'impact de la fragmentation sur les visiteurs majoritaires de *C. palustre*, c'est-à-dire les bourdons et abeilles solitaires, a été estimé au niveau de la population et du paysage. Ces visiteurs présentent des réponses contrastées vis-à-vis des différentes composantes de la fragmentation (Steffan-Dewenter *et al.* 2002 ; Zurbuchen *et al.* 2010).

L'importance de la surface occupée par la population végétale est régulièrement citée pour expliquer les variations de l'abondance et du comportement de visite des insectes (Dauber *et al.* 2010 ; Viana *et al.* 2012 ; Kennedy *et al.* 2013). Cependant, aucune incidence de la surface occupée par les populations de *C. palustre* sur l'abondance des bourdons et des abeilles solitaires n'a été mise en évidence, contrairement à ce qui avait été décrit dans une étude réalisée par Mayer *et al.* (2012b) en 2009 dans quatre populations de *C. palustre*. Le faible nombre de populations considérées (4) et l'unicité des observations sur une seule année expliqueraient les résultats observés lors de cette étude préliminaire. D'autres caractéristiques spatiales pourraient influencer l'abondance des insectes visiteurs majoritaires puisque la diversité des éléments du paysage est notamment soulignée dans la littérature (Pickett & Cadenasso 1995). La présente étude le confirme via l'influence sur les bourdons et abeilles solitaires de la proportion de zones boisées au niveau du paysage et de lisières forestières.

L'étude de la structure spatiale des populations de *C. palustre* suivant une approche multiscalaire a permis de mettre en évidence l'influence sur l'abondance des

bourdons et des abeilles solitaires de zones boisées au niveau du paysage. Un taux de visite élevé pour les bourdons dans un paysage boisé est sans doute dû au rôle de barrière que les massifs forestiers peuvent jouer dans le mouvement des espèces tels que *Bombus lapidarius* et *B. terrestris* (61% des visiteurs du genre *Bombus*). En effet, ces deux espèces présentent une préférence marquée pour les milieux ouverts (Svensson *et al.* 2000) dans lesquels les individus butinent jusqu'à environ 450 et 800 m de leur nid, respectivement pour *B. lapidarius* et *B. terrestris* (Knight *et al.* 2005a). Cette hypothèse a également été formulée dans une étude réalisée par Diaz-Forero *et al.* (2011) en Estonie sur 24 espèces de bourdons dans un paysage boisé. Il y est notamment précisé que les individus de *B. terrestris* présentent une limitation de leurs déplacements et qu'ils butinent majoritairement dans un rayon de 600 m autour de leur nid. Les autres espèces majoritaires de bourdons rencontrées sur nos sites d'étude (*B. lapidarius*, *B. pascuorum* et *B. hypnorum*) présentent un rayon de butinage autour de la colonie similaire à celui de *B. terrestris* en paysage boisé. La restriction des mouvements des bourdons dans un paysage boisé favorise les déplacements à faibles distances et augmente le taux de visite des fleurs au sein des plages offrant le plus de ressources florales (pollen et nectar). Le taux de visite élevé observé pour les abeilles solitaires sur les fleurs de *C. palustre* dans un paysage boisé est sans doute davantage lié à leurs déplacements généralement limités à un rayon de 300 m autour de leur nid (Gathmann & Tscharrntke 2002) qu'à leur restriction due aux zones boisées, ce que suggère une étude de Zurbuchen *et al.* (2010).

Les lisières forestières, qui représentent la limite de contact entre le milieu tourbeux humide et les zones boisées, ont un impact positif sur les bourdons et abeilles solitaires. Ces observations peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs. Tout d'abord, les lisières forestières représentent des sites de nidification favorables pour les bourdons et les abeilles solitaires terricoles, en particulier au sein des milieux tourbeux humides soumis aux variations du niveau de la nappe perchée. En effet, les zones boisées sont majoritairement localisées dans des zones sèches, tant au niveau de zones dont le niveau de la nappe perchée est plus bas suite aux opérations de drainage pratiquées (Lieffers & Rothwell 1987 ; Cubizolle *et al.* 2010), que sur des zones naturellement surélevées par rapport à la nappe perchée. En particulier, *Bombus pascuorum* et *B. pratorum* sont décrits dans la littérature comme deux espèces associées aux zones boisées et aux lisières forestières (Benton 2006 ; Diaz-Forero *et al.* 2011). En effet, *B. pascuorum* nidifie préférentiellement au niveau de la litière forestière (Benton 2006) ; alors que l'association de *B. pratorum* aux lisières forestières est plutôt due à son émergence précoce au printemps et sa dépendance vis-à-vis des ressources florales des saules (Sepp *et al.* 2004).

D'autre part, les lisières forestières sont généralement caractérisées par une régulation des conditions microclimatiques (température, vent, humidité) pouvant y favoriser le butinage des insectes durant les périodes les plus chaudes, hypothèse

6.1. La communauté des insectes pollinisateurs

également émise par Söderström *et al.* (2001). Une proportion élevée de lisières forestières permet donc une augmentation des potentialités de nidification ainsi que des interactions entre ces sites et le milieu tourbeux humide servant de zone de butinage. Cette hypothèse est étayée par une étude menée par Artz & Waddington (2006) reportant une abondance des pollinisateurs de *Asclepias lanceolata* (Asclépiadacées) plus élevée à proximité de zones boisées.

Enfin, le morcellement des zones boisées au sein de la population a pour effet de favoriser le mouvement des espèces de bourdons au sein de la matrice paysagère. En effet, les individus de *B. lapidarius* et *B. pascuorum*, collectés sur les fleurs de *C. palustre*, butinaient également sur *Ranunculus acris* et *Trifolium pratense* (Chapitre 3). L'analyse de leurs pelotes de pollen a permis de déterminer ces deux espèces végétales comme faisant partie de leur réseau alimentaire. Or, ces deux espèces végétales se rencontrent sur les bords de chemins, sur les talus ou dans les prairies à proximité des milieux tourbeux dans lesquels l'étude a eu lieu. Les bords de routes et les talus représentent dès lors des sites de nidification pour *B. lapidarius* (Carvell *et al.* 2004 ; Hopwood 2008) mais aussi des zones de butinage, ce que confirme la présente étude.

Ces résultats soulignent le rôle que la diversité des éléments du paysage autour d'un fragment de biotope peut jouer sur l'abondance et le mouvement des pollinisateurs. L'impact des zones boisées et des lisières forestières sur l'abondance et le mouvement des bourdons et des abeilles solitaires reste, à ce jour, assez peu étudié en régions tempérées (Kreyer *et al.* 2004 ; Winfree 2010 ; Zurbuchen *et al.* 2010 ; Diaz-Forero *et al.* 2011 ; Fabian *et al.* 2013). Parmi ces études, seule celle menée par Diaz-Forero *et al.* (2011) démontre une limitation dans le déplacement des espèces du genre *Bombus* dans un paysage boisé ; alors que celle menée par Fabian *et al.* (2013) souligne le rôle des zones boisées comme sources de pollinisateurs pour les espèces végétales des milieux ouverts et des cultures. Les autres études menées dans un paysage majoritairement composé de milieux semi-naturels ouverts, suggèrent un effet neutre des zones boisées sur les mouvements des bourdons et abeilles solitaires. De manière générale, la distance entre fragments de biotopes semi-naturels ouverts au sein d'un paysage fragmenté est le facteur qui y détermine les mouvements et l'abondance des pollinisateurs. En fonction de la capacité de déplacement de l'espèce ou de l'individu, la fragmentation aura un effet plus ou moins intense sur leurs mouvements (Walther-Hellwig & Frankl 2000 ; Osborne *et al.* 2008).

L'impact des zones boisées sur l'abondance et la dispersion des pollinisateurs est mieux documenté pour les espèces de la famille des Lépidoptères. L'impact peut être négatif, neutre ou positif (Stevens *et al.* 2010 ; Körösi *et al.* 2012 ; Krämer *et al.* 2012 ; Slamova *et al.* 2013). Plus précisément, une méta-analyse réalisée par Stevens *et al.* (2010) souligne que chaque espèce de Lépidoptère répond différemment à la présence des zones boisées. Toutefois la qualité du fragment, c'est-à-dire de l'habitat

dans lequel se retrouvent les populations animales, a une influence sur l'abondance des individus (Körösi *et al.* 2012 ; Krämer *et al.* 2012). Dans le cas d'espèces telles que les bourdons et les abeilles solitaires, la qualité de leur habitat se définit par les possibilités de nidification ainsi que les ressources florales à proximité du nid (Westrich 1996). Ces espèces pouvant se disperser parfois sur plusieurs kilomètres, les sites peuvent être localisés dans des biotopes différents (Westrich 1996 ; Westphal *et al.* 2006). Les milieux tourbeux humides ne représentant généralement pas des sites de nidification favorables pour les bourdons et abeilles solitaires terricoles, leur abondance dans ces biotopes s'expliquerait donc d'une part, via l'abondance des ressources florales et de leur qualité ; et d'autre part, via les potentialités de nidification aux abords ou dans les biotopes au sein de la matrice paysagère (lisières forestières, prairies semi-naturelles, landes, bords de routes). L'importance des milieux semi-naturels autour d'un fragment comme sources favorisant l'abondance des bourdons et abeilles solitaires au sein du fragment est mentionnée dans diverses études. Notamment, deux études, l'une de Öckinger & Smith (2007) et l'autre de Hatfield & LeBuhn (2007), soulignent l'importance de la proximité des milieux semi-naturels offrant des sites de nidification, sur l'abondance des bourdons dans les fragments n'offrant pas ces possibilités. En raison de leur capacité de déplacements, les bourdons perçoivent les fragments de biotopes semi-naturels comme une continuité et non des îles isolées dans une matrice inhospitalière, ce qui expliquerait que leurs déplacements et leur abondance soient généralement influencés par les caractéristiques paysagères et non par les caractéristiques propres au fragment (Steffan-Dewenter *et al.* 2002).

6.1.2 Impact des ressources florales sur les pollinisateurs

L'étude de la structure spatiale des populations de *C. palustre* a permis de mettre en évidence une influence positive de la densité de fleurs de *C. palustre* dans les populations sur l'abondance des bourdons (Chapitre 2). Dans la littérature, plusieurs études citent l'effet positif de la densité de fleurs sur l'abondance et le comportement de visite des bourdons (Knight 2003 ; Grindeland *et al.* 2005 ; Elliott & Irwin 2009 ; Dauber *et al.* 2010). Cette abondance serait liée au fait que les ressources florales (pollen et nectar) sont plus abondantes lorsque la densité de fleurs est élevée et ce à faible coût énergétique pour les pollinisateurs (Fontaine *et al.* 2008 ; Hagberg & Nieh 2012).

Les résultats relatifs aux ressources florales de *C. palustre* révèlent que la composition du pollen et du nectar de *C. palustre* en font une espèce attractive pour les bourdons, ce qui expliquerait qu'il soit la source majoritaire de pollen dans les pelotes corbiculaires des espèces du genre *Bombus* (Chapitre 3). Le nectar de *C. palustre* est en effet décrit comme étant très attractif et la raison principale des visites des

6.1. La communauté des insectes pollinisateurs

insectes dans l'étude de Guillén *et al.* (2005), alors qu'il est précisé dans l'étude menée par Olesen & Warncke (1992) que les fleurs sont visitées par les Apoïdes pour le nectar et pour le pollen. D'une part, les résultats montrent que son pollen est riche en acides aminés, en particulier proline et acides aminés essentiels, ainsi qu'en phytostérols, en particulier le 24-méthylènecholestérol/campestérol, le δ^5 -avénastérol et le β -sitostérol. Dans la littérature, ces composés sont considérés comme ayant une influence positive sur le développement des larves de *B. terrestris* et d'abeilles solitaires en conditions expérimentales (Génissel *et al.* 2002 ; Rasmont *et al.* 2005b ; Tasei & Aupinel 2008 ; Weiner *et al.* 2010). D'autre part, les fleurs de *C. palustre* produisent une quantité abondante de nectar (1,2 μ L/fleur) contenant en moyenne 0,27 mg de sucres/g de nectar. La qualité des ressources florales de *C. palustre* qui sont facilement accessibles grâce à la morphologie de la fleur, couplée à la densité florale permet d'expliquer l'abondance des bourdons au niveau des plages de *C. palustre*.

Les résultats montrent également que la qualité du pollen de *Trifolium pratense* est similaire à celle de *C. palustre*, et que *B. lapidarius* et *B. pascuorum* récoltent du pollen principalement sur ces deux espèces. Les résultats relatifs à la constance de *B. lapidarius* dans les prairies para-tourbeuses confirment ceux obtenus lors d'une étude sur la qualité des aménagements des bandes enherbées en zones agricoles (Carvell *et al.* 2006b), puisque *B. lapidarius* y est décrit comme constant pendant la récolte de pollen, collectant le pollen principalement sur une ou deux espèces végétales. Le faible nombre d'individus de *B. pascuorum* échantillonnés ne permet pas de comparaison précise. Il est admis que *T. pratense*, ainsi que les espèces de la famille des Fabacées, représentent des espèces-clés dans le réseau alimentaire du genre *Bombus* dans les milieux semi-naturels et agricoles (Goulson & Darvill 2004 ; Biesmeijer *et al.* 2006 ; Kleijn & Raemakers 2008 ; Connop *et al.* 2010). En particulier, une étude menée par Goulson & Darvill 2004 a montré que *T. pratense* était l'une des espèces majoritairement visitées pour la récolte du pollen et du nectar par les espèces du genre *Bombus*, alors que cette espèce présentait une abondance inférieure à celle des autres espèces végétales. Les bourdons seraient donc capables d'évaluer la qualité chimique de leurs ressources (Kitaoka & Nieh 2009) et de récolter du pollen à haute teneur en protéines (Hanley *et al.* 2008 ; Leonhardt & Blüthgen 2012), ce que confirme la présente étude.

Toutefois, les individus de *B. terrestris s.l.* et de *B. hypnorum* semblent collecter du pollen sur des espèces végétales de moindre qualité comme *Valeriana repens* et *Cirsium palustre*, contrairement aux individus de *B. lapidarius* et de *B. pascuorum*. Une étude de Fontaine *et al.* 2008 rapporte que les individus de *B. terrestris s.l.* présentent une diète plus large en conditions de compétition pour les ressources, ressources qui pourraient être de moindre qualité. En particulier, les individus de *B. terrestris s.l.* sont les seuls à collecter le pollen de *Cirsium palustre* (jusqu'à 77%). Or, ce pollen est riche en δ^7 -stigmastérol (24,3-30,1%) qui ne peut être digéré par les bourdons puisqu'ils sont dépourvus de l'enzyme isomérase permettant de briser

la liaison $\delta - 7$ (Canavoso *et al.* 2001 ; Janson *et al.* 2009). Il serait donc pertinent d'étudier l'impact de la diète sur le développement des larves et des colonies des différentes espèces de *Bombus* investiguées. Nous serions dès lors en mesure de caractériser la qualité nutritionnelle du pollen des espèces typiques des milieux tourbeux humides durant la période de floraison de *C. palustre*.

Outre une composition relativement hétérogène du pollen des différentes espèces végétales analysées, la présente étude montre également une variabilité du volume et de la concentration du nectar produit par ces espèces végétales (Chapitre 3). Leur analyse a montré que les différentes espèces végétales présentes dans les pelotes de pollen des bourdons collectés représentaient des sources de nectar de qualité. Ces mesures confirment les observations faites lors d'une étude menée par Comba *et al.* 1999 sur les sources de nectar pour les bourdons dans les jardins aménagés. En effet, *Lychnis flos-cuculi* et *Trifolium pratense* y sont décrits comme sources de nectar pour *B. lapidarius*, *B. pascuorum* et *B. terrestris*. Les espèces du genre *Cirsium* sont également décrites dans la littérature comme source de nectar pour les bourdons (Goulson & Darvill 2004 ; Nagamitsu *et al.* 2007 ; Tiley 2010).

L'analyse des pelotes confirme le polylectisme des quatre espèces de bourdons investiguées. Au vu des compositions variées du pollen des différentes espèces végétales et des différences existant entre leurs nectars (volume et concentration), le polylectisme des bourdons peut s'expliquer par leurs exigences pour les composés intervenant dans le fonctionnement du métabolisme des adultes et des larves. Toutefois ce polylectisme semble représenter une contrainte (Haider *et al.* 2013) puisque le pollen de *Cirsium palustre* peut être considéré comme de mauvaise qualité. La présente étude souligne donc l'importance de la diversité des ressources florales pour les espèces du genre *Bombus* à proximité des colonies, et donc propre aux fragments tourbeux, hypothèse également émise par Jha & Kremen (2012) en paysage agricole. La présente étude souligne que les milieux tourbeux humides représenteraient des sites de butinage de qualité.

6.1.3 Le cas de la restauration du site de Stockem

Jusqu'à présent, l'impact d'une restauration écologique sur la communauté des insectes pollinisateurs, en particulier du genre *Bombus*, en milieu humide n'a que rarement été étudié. A notre connaissance, seules deux études décrivent l'impact d'une restauration en milieu humide sur les Apoïdes. La première décrit la réponse de différentes espèces d'abeilles sauvages suite à la restauration d'une ripisylve le long de la rivière Sacramento (Etats-Unis ; Williams 2011) ; tandis que la seconde décrit la réponse de différentes abeilles sauvages et papillons dans des marais au Michigan (Etats-Unis ; Fiedler *et al.* 2012). La majorité des études se concentrent en effet sur le suivi des conditions édaphiques et des communautés végétales (Metsoja

6.1. La communauté des insectes pollinisateurs

et al. 2012 ; Hedberg *et al.* 2012).

La discussion ci-après est une interprétation de l'effet de la restauration écologique d'un bas-marais à Stockem sur les espèces du genre *Bombus* sur base des résultats présentés dans les deux paragraphes précédents.

D'une part, le déboisement des massifs de saules dans le site de Stockem en 2007 a eu un impact positif sur la dynamique de la végétation (Figure 6.1) via le développement d'espèces pionnières typiques des milieux tourbeux à eaux libres, dont notamment *Comarum palustre*, *Menyanthes trifoliata* et *Utricularia minor*, ou encore *Phragmites australis* et *Typha latifolia*, espèces typiques de milieux plus eutrophes (Schumann & Mauersberger 2009 ; Sarneel & Soons 2012 ; Sundberg 2012 ; Zerbe *et al.* 2013). Cependant, le développement de *P. australis* ou *T. latifolia* pourrait menacer la diversité spécifique si aucune gestion du site n'est appliquée (Frankard 2004 ; Verté 2007 ; Van Rossum *et al.* 2012). Un rétablissement de la végétation herbacée pionnière d'un bas-marais suite à la coupe des arbres est également décrit dans une étude réalisée en Suède par Sundberg (2012). Le développement de l'abondance, notamment *C. palustre* qui fournit du pollen de qualité (Chapitre 3), et de l'hétérogénéité (*Cirsium palustre*, *Lychnis flos-cuculi*, *Persicaria bistorta* et *Valeriana repens*) des ressources florales dans le milieu restauré, a permis l'amélioration de la qualité de l'habitat des bourdons. En outre, les rejets de *Salix* sp. offrent des fleurs qui représentent une source de pollen non négligeable lors de l'émergence des reines au printemps (Génissel *et al.* 2002 ; Goulson 2009 ; Diaz-Forero *et al.* 2011).

D'autre part, le bas-marais restauré est localisé au sein de zones adéquates pour l'installation des colonies de bourdons tels que les bords de route, sablière et lisières forestières (Westrich 1996 ; Jacob & Remacle 2005 ; Hopwood 2008 ; Winfree 2010). De ce fait, la restauration du bas-marais en tant que zone de butinage disposant de ressources florales nécessaires au développement des colonies environnantes, a permis d'y augmenter l'abondance et la diversité des espèces du genre *Bombus*. Ainsi, la présence de sites de nidification et l'abondance des ressources ont notamment favorisé le développement des colonies de *Bombus pascuorum*. La qualité de l'habitat permettant de soutenir une population de *B. pascuorum* saine a favorisé le développement du bourdon parasite¹ qui lui est inféodé *B. campestris*. L'impact de la densité de nids et de l'abondance des ressources florales sur les bourdons hôtes et parasites, en particulier *B. terrestris* et *B. vestalis*, a été notamment montré par des études de Russell *et al.* (2005) et Carvell *et al.* (2008).

1. Bourdons parasites ou « cuckoo-bumblebees » : espèces du sous-genre *Psithyrus* qui représentent une lignée spécialisée ayant perdu le comportement social et qui se distinguent de leurs hôtes par l'absence de corbeille et par l'incapacité de récolter du pollen. Elles sont considérées comme étant des espèces cleptoparasites dans les colonies d'autres bourdons (Benton 2006)



FIGURE 6.1: Evolution de la végétation sur le site restauré de Stockem entre 2008 et 2012. (photographies : L. Somme)

6.2 Reproduction sexuée et multiplication végétative de *Comarum palustre*

De manière générale, les populations d'espèces végétales issues de la fragmentation du paysage représentent des populations relictuelles isolées. Elles sont considérées comme appauvries génétiquement et consanguines ou en voie de l'être (Young *et al.* 1996 ; Aguilar *et al.* 2008). Ceci peut compromettre la persistance à long terme de ces populations malgré un habitat de qualité (Paul 2003 ; Mhemmed *et al.* 2008). D'autre part, le type de mode de reproduction peut aussi avoir une influence importante sur la démographie de ces populations d'espèces végétales. L'étude de la structure des populations et des flux de gènes est donc primordiale. Dans le cadre de la conservation de ces espèces, la restauration des flux de gènes (pollen ou graines) et la création de zones relais (« stepping-stones ») au sein ou entre populations pourrait s'avérer indispensable (Kwak *et al.* 1998 ; Aavik *et al.* 2013).

6.2.1 Mode de reproduction

Au cours de la présente étude, il a été mis en évidence que l'autopollinisation spontanée des fleurs de *Comarum palustre* menait à une mise à graines moyenne de 6% en conditions contrôlées (Chapitre 5). La mise à graines après autopollinisation manuelle est en moyenne de 28% en conditions contrôlées. Comme il s'agit du transfert de pollen des anthères d'une fleur sur les stigmates de la même fleur, il existe probablement un recouvrement des phases mâle et femelle. La protandrie des fleurs de *C. palustre* ne serait donc pas totale. Une étude réalisée par Olesen & Warncke (1992) au Danemark en conditions naturelles rapporte que la mise à graines par autopollinisation spontanée est en moyenne de 22%, ce qui renforce l'hypothèse de la protandrie partielle. Le recouvrement des phases mâle et femelle chez les espèces protandres est décrit notamment chez *Delphinium barbeyi* (Renonculacées ; Williams *et al.* 2001), *Knautia arvensis* (Dipsacacées ; Vange 2002), *Saponaria officinalis* (Caryophyllacées ; Davis & Turner-Jones 2008), et *Impatiens glandulifera* et *I. parviflora* (Balsaminacées ; Vervoort *et al.* 2011). La protandrie ne représenterait donc pas un mécanisme empêchant complètement l'autopollinisation. Au contraire, la protogynie, induisant la réceptivité stigmatique préalablement à la maturité des anthères, est considérée comme un mécanisme efficace contre l'autopollinisation et favorise la fécondation croisée (Lloyd 1992 ; Kalisz *et al.* 2004).

Les résultats relatifs au mode de reproduction de *C. palustre* montrent également que l'origine du pollen n'influence pas la mise à graines en conditions contrôlées puisqu'elle est de 36% après gitonopollinisation et de 38% après allopollinisation. Ceci implique que *C. palustre* est une espèce auto-compatible. Toutefois l'étude menée par Olesen & Warncke (1992) montre que l'origine du pollen influence la mise à

graines en conditions naturelles puisqu'elle est de 30% après gitono-pollinisation et 48% après allopollinisation. *Comarum palustre* est donc auto-compatible et présente un mode de reproduction mixte, ce qui confirme l'étude de Guillén *et al.* (2005). De plus, les résultats relatifs au taux d'allogamie dans quatre populations de *C. palustre* confirment le mode de reproduction mixte (Chapitre 5). Selon Vogler & Kalisz 2001, au moins 33% des espèces végétales présentent un mode de reproduction mixte. Les différents facteurs pouvant promouvoir ce mode de reproduction sont la disponibilité en pollinisateurs, la limitation de transfert de pollen, ainsi que les facteurs environnementaux déterminant l'intensité de la dépression de consanguinité (Baker 1955 ; Lloyd 1992 ; Kalisz *et al.* 2004). La différence observée entre la mise à graines en conditions contrôlées et naturelles est sans doute issue de variations locales de l'environnement en conditions naturelles telles que la richesse des sols et la disponibilité en eau (Agren *et al.* 2008). En outre, la physiologie inhérente à *C. palustre*, notamment via l'allocation des ressources entre ramets et fleurs au sein des ramets, pourrait influencer la mise à graines (Rautiainen *et al.* 2004 ; Wesselingh 2007).

L'auto-compatibilité et le mode de reproduction mixte de *C. palustre* posent la question de la dépression de consanguinité qui pourrait en résulter. Dans ce cadre, il a été mis en évidence que *C. palustre* ne souffre pas de dépression de consanguinité lors de la mise à graines ($\delta = 0,05$). Toutefois, il n'a pas été testé si *C. palustre* souffrait de dépression de consanguinité lors des étapes ultérieures de son cycle de développement, c'est-à-dire lors de la germination, du recrutement des plantules, de leur croissance et de leur reproduction. Or, selon les résultats obtenus par Olesen & Warncke (1992), la germination des graines issues d'autopollinisation est de 41% alors qu'elle est de 48% pour celles issues d'allopollinisation. Ces taux de germination correspondent à un indice de dépression de consanguinité $\delta = 0,15$. La pression de sélection sur les plantules pourrait donc avoir lieu au moment de la germination. Il serait donc opportun d'étudier l'effet de l'autogamie sur l'entièreté du cycle de développement des individus de *C. palustre* afin de savoir si cette espèce souffre globalement de dépression de consanguinité. De plus, la réalisation de cette étude en conditions naturelles permettrait une estimation plus précise de l'effet de la dépression de consanguinité sur le développement des individus (Roff 1997 cité dans Goodwillie *et al.* 2005).

Diverses études menées sur des espèces végétales des milieux tourbeux et présentant un mode de reproduction mixte principalement allogame montrent également une pression de sélection aux stades précoces de développement, dont par exemple *Vaccinium myrtillus* (Ericacées ; Raspé *et al.* 2004) et *Calluna vulgaris* (Ericacées ; Mahy & Jacquemart 1999). Une méta-analyse de Goodwillie *et al.* (2005) décrit l'effet de la dépression de consanguinité chez les espèces à dominance allogame dès la mise à graines et la germination. La dépression de consanguinité agissant aux stades précoces du développement des individus implique des allèles récessifs délétères. Elle est significativement plus faible chez les espèces majoritari-

rement autogames que chez les espèces majoritairement allogames, ce qui suggère la purge de ces allèles chez les premières (Goodwillie *et al.* 2005).

6.2.2 Pollinisation entomophile

Les pollinisations manuelles en conditions naturelles ont permis de mettre en évidence que l'espèce montrait une limitation de transfert de pollen (Chapitre 2). En effet, la mise à graines des fleurs pollinisées naturellement (contrôles) était inférieure à celle des fleurs avec pollinisation manuelle supplémentaire dans les populations de Bra (10% vs. 39%) et de Stockem (58% vs. 79%) en 2012. Aucune limitation de transfert de pollen n'a été observée dans les autres populations en 2012. En outre, les pollinisations manuelles ont mis en évidence qu'aucune population ne souffrait de limitation de transfert de pollen en 2010 et 2011. La limitation de transfert de pollen induisant une diminution du succès reproducteur est donc un phénomène qui présente des variations spatiales et temporelles, parfois au sein d'une même population. Une méta-analyse réalisée sur 258 espèces végétales par Ashman *et al.* (2004) souligne en effet que 62% de ces espèces végétales montrent une limitation de transfert de pollen. De manière générale, elle est issue d'une stochasticité dans la pollinisation ou d'une oscillation aléatoire autour d'un équilibre (« Haig & Westoby equilibrium ») entre la disponibilité en pollen et les ressources assurant la maturation des graines ou des fruits (Haig & Westoby 1988 ; Ashman *et al.* 2004 ; Wesselingh 2007 ; González-Varo *et al.* 2009).

Les espèces végétales à pollinisation entomophile et auto-compatibles, telles que *C. palustre*, sont généralement considérées comme moins sensibles à une limitation du transfert de pollen (Larson & Barrett 2000 ; Knight *et al.* 2005b). Dans le cas de *C. palustre*, la limitation du transfert de pollen observée dans les deux populations en 2012 serait liée à un déficit de pollinisateurs, en particulier des bourdons et des abeilles solitaires, puisqu'aucun Apoïde n'a été observé à Bra et seul un individu du genre *Bombus* à Stockem en 2012. Ce déficit de pollinisateurs était dû à des conditions météorologiques défavorables aux insectes pollinisateurs (Chapitre 2). De plus, la mise à graines des fleurs pollinisées naturellement semble corrélée aux taux de visite des bourdons et des abeilles solitaires (Chapitre 2). Le nombre de visites nécessaires pour maximiser la mise à graines dépend de la qualité des visites. Cette qualité est définie par la quantité de pollen disponible pour la pollinisation au niveau du corps de l'insecte pollinisateur, le nombre de stigmates sur lesquels le pollen est transféré et la compatibilité du pollen déposé. Puisque *C. palustre* est auto-compatible, tout grain de pollen conspécifique transféré par un insecte pollinisateur sur un stigmate sera susceptible d'y féconder l'ovule (Olesen & Warncke 1992).

De manière générale, les bourdons sont considérés comme étant des vecteurs de pollen efficaces de par la quantité de pollen transporté au niveau de leur corps et

déposé sur les stigmates, en dépit de leur propension à accumuler le pollen dans des pelotes au niveau des corbicules. Le pollen accumulé en pelotes est dès lors perdu pour la pollinisation (e.g. Schlindwein et al. 2005). A titre d'exemple, les bourdons ont été décrits comme les pollinisateurs les plus efficaces pour deux espèces auto-compatibles, *Impatiens capensis* (Balsaminacées ; Young et al. 2007) et *Fritillaria meleagris* (Liliacées ; Zych et al. 2013), vis-à-vis respectivement de l'abeille domestique et de deux espèces d'abeilles solitaires. Toutefois l'efficacité des visiteurs de *C. palustre*, notamment en termes de pollen prélevé comparé au pollen déposé par visite unique d'un visiteur particulier (Ivey et al. 2003), n'a pas été testée dans la présente étude.

La qualité d'un visiteur en tant que pollinisateur peut être également déterminée par son comportement de récolte. En effet, un insecte fidèle à une espèce végétale, c'est-à-dire visitant les fleurs de cette espèce en séquence lors de la collecte des ressources florales (Waser 1986), aura un impact positif sur le succès reproducteur de l'espèce végétale visitée. Cette fidélité est considérée bénéfique pour les espèces végétales puisque cela limite la perte de pollen conspécifique et le risque de dépôt de pollen hétérospécifique sur les stigmates, ce qui induit le « stigma clogging » et une diminution du succès reproducteur (Waser 1986 ; Gruter & Ratnieks 2011). Les résultats de l'étude de la composition des pelotes corbiculaires de quatre espèces du genre *Bombus* montrent que les espèces les plus fidèles aux fleurs de *C. palustre* lors de la récolte de pollen sont *B. pascuorum* (80% de pelotes pures), *B. lapidarius* (75%) et *B. hypnorum* (64%), alors que l'espèce la moins fidèle est *B. terrestris s.l.* (33%). Des résultats similaires pour *B. lapidarius* et *B. terrestris s.l.* ont été obtenus dans une étude de Carvell et al. 2006b dans un paysage agricole. La fidélité de *B. pascuorum*, *B. lapidarius* et *B. hypnorum* vis-à-vis des fleurs de *C. palustre* aurait donc un impact positif sur le succès reproducteur de l'espèce végétale. Toutefois, la composition des pelotes de pollen des individus de *B. terrestris s.l.* et de *B. lapidarius* collectés dans la population de Joubiéval révèle que leurs pelotes peuvent contenir entre 4,5 et 15,5% de pollen de *Mimulus guttatus* (Scrophulariacées), espèce végétale exotique envahissante. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'un partage des pollinisateurs entre *C. palustre* et *M. guttatus* dans la population de Joubiéval (Chapitre 3). Or, les espèces exotiques envahissantes, seconde menace pour la biodiversité après la destruction et la fragmentation des habitats (Wilcove et al. 1998), peuvent avoir un impact négatif sur le succès reproducteur des espèces végétales indigènes via le détournement des pollinisateurs (Chittka & Schürkens 2001 ; Hulme & Bremner 2006 ; Bartomeus et al. 2010 ; Cawoy et al. 2012). Des pieds d'*Impatiens glandulifera*, autre espèce exotique envahissante, étant présents au sein de la population de Fosse (Figure 6.2), une étude plus approfondie de l'impact de *M. guttatus* et d'*I. glandulifera* sur le réseau de pollinisation de *C. palustre* permettrait de déterminer les risques que représente le développement de ces espèces exotiques envahissantes dans un milieu tourbeux humide et leur impact sur le

6.2. Reproduction sexuée et multiplication végétative de *Comarum palustre*

succès reproducteur de l'espèce végétale indigène.



(a)



(b)

FIGURE 6.2: Plage de (a) *Mimulus guttatus* dans la population de *Comarum palustre* de Joubiéval et (b) d'*Impatiens glandulifera* dans la population de Fosse. (photographies : L. Somme)

6.2.3 Multiplication végétative et structure clonale

L'identification génétique des ramets grâce à l'utilisation de marqueurs microsatellites a permis de déterminer la diversité génétique des clones de *C. palustre*, leur architecture spatiale et leur taille au sein des différentes populations étudiées.

Au travers des six populations étudiées d'un point de vue de la structure et de la diversité génétique, le nombre d'individus déterminés variait entre un dans la population de Stockem et 53 dans la population de Vance (Chapitres 4 et 5). Bien que les populations occupent des surfaces variant entre 253 et 7450 m², aucune influence de leur surface sur la richesse génotypique des populations n'a été mise en évidence. Nous estimons toutefois que l'effort d'échantillonnage pratiqué dans les différentes populations ne permet pas une comparaison adéquate. En effet, un échantillonnage complet de deux populations occupant chacune 600 et 1450 m² a permis d'y déterminer respectivement 22 et 21 génotypes ; alors que 53 génotypes ont été déterminés via l'échantillonnage d'un quadrat de 400 m² dans la population de Vance. Outre la surface occupée par une population, l'historique de gestion des biotopes abritant les populations végétales est décrit comme ayant une influence sur leur richesse génotypique (Sammul *et al.* 2004 ; Galeuchet *et al.* 2005 ; Münzbergová *et al.* 2013). Ainsi, le pâturage extensif est favorable à la diversité génotypique de *Medicago sativa* ssp. *falcata* (Fabacées ; Kaljund *et al.* 2013) et la fauche avec exportation est favorable à la diversité génotypique de *Elytrigia atherica* (Poacées ; Veeneklaas *et al.* 2011). Les différentes populations de *C. palustre* étudiées étant caractérisées par un historique de gestion différent (radeau flottant, bas-marais de fauche, bas-marais restauré, pâtures extensives), la diversité génotypique qui y est observée serait sans doute plutôt due à l'historique de gestion de ces populations.

L'étude de la structure des populations a révélé que l'architecture clonale de *C. palustre* était de type « phalange » puisque les individus se présentent sous forme de plages de clones dont les ramets d'un même individu sont agrégés. Ce type d'architecture clonale est également décrit chez d'autres espèces des milieux tourbeux, notamment *Menyanthes trifoliata* (Méniyanthacées ; Jaabova *et al.*, unpubl. data) et *V. uliginosum* (Ericacées ; Albert *et al.* 2005). Toutefois, une légère variabilité de l'architecture clonale a été mise en évidence dans la population de Fosse puisqu'un entrelacement des ramets de différents individus a été révélé au sein d'un des quadrats échantillonnés (voir Figure 5.1). Ce type d'architecture correspond plus à une architecture de type « guerilla », caractérisée par des connections plus longues entre ramets et donc une probabilité supérieure de mélange entre individus. Une variation de l'architecture clonale a également été décrite chez *Ranunculus repens* (Renonculacées ; Lovett-Doust 1981) et les deux espèces du genre *Vaccinium* précédemment évoquées (Albert *et al.* 2004 ; Albert *et al.* 2005). L'impact des conditions biotiques (e.g. densité, composition et hauteur de la végétation) et abiotiques (e.g. altitude, composition du sol, engorgement en eau) sur la croissance des rhizomes de *C.*

6.2. Reproduction sexuée et multiplication végétative de *Comarum palustre*

palustre a été caractérisé dans une étude de Macek & Lepš (2007) menée dans 32 sites en Tchéquie. Leur étude montre en particulier que la longueur des inter-noeuds des rhizomes de *C. palustre* est positivement corrélée à la densité et la hauteur de la végétation environnante. En d'autres termes, plus la végétation est dense et haute, plus les clones présentent une occupation de l'espace qui serait donc de type « guérilla » (Lovett-Doust 1981). Cette occupation de l'espace est décrite par la stratégie de « foraging » (Kroons & Hutchings 1995), stratégie adoptée par un individu qui vise à maximiser l'acquisition des ressources dans un environnement peu favorable en concentrant ses ramets dans les sites favorables. L'architecture clonale ne serait donc pas un trait fixé pour une espèce donnée et traduirait plutôt une plasticité phénotypique vis-à-vis de la variabilité des conditions environnementales. Il est à noter également que l'agrégation des individus de *C. palustre* dans les prairies paratourbeuses étudiées pourrait être également influencée par l'herbivorie tel qu'évoqué dans l'étude de Kleijn & Steinger (2002) relative à l'agrégation spatiale des clones de *Veratrum album* (Liliacées).

L'étude la structure des populations révèle également que la surface occupée par un individu de *C. palustre* varie entre 0,3 et 42,8 m². Une occupation de l'espace similaire est décrite pour une autre espèce pionnière inféodée aux milieux tourbeux humides *M. trifoliata* (Jaabova et al. unpubl. manuscript). Toutefois, la surface occupée par un individu peut être extrêmement variable d'une espèce et d'une famille à l'autre. A titre d'exemple, un individu de *Sasa senanensis* (Poacées ; Suyama et al. 2000) peut s'étendre sur près de 300 m alors qu'un individu de *Posidonia oceanica* (Posidoniacées) peut s'étendre sur près de 15 km (Arnaud-Haond et al. 2012). Différents facteurs sont décrits dans la littérature comme influençant la surface occupée par un individu au sein d'une même espèce. Il est généralement considéré qu'elle peut être soit génétiquement déterminée, reflétant la vitesse de croissance et/ou la capacité compétitrice inter-individuelle (Huber et al. 1999 ; Rautiainen et al. 2004), soit influencée par son âge (Tanner 2001 ; de Witte & Stocklin 2010 ; Arnaud-Haond et al. 2012) et/ou des facteurs biotiques (Huhta et al. 2000) et abiotiques (Stuefer & Huber 1998 ; Lenssen et al. 2004 ; Louâpre et al. 2012). En particulier, l'étude de Macek & Lepš (2007) montre que les individus de *C. palustre* qui se développent dans une végétation haute et dense présentent une longueur et un réseau de rhizomes plus importants. Les activités anthropiques telles que le pâturage et la fauche sont également décrites comme ayant un impact sur la surface occupée par un individu (Austin et al. 2007). Le pâturage, via le piétinement du bétail peut induire une rupture des rhizomes, limitant la croissance des individus (Rosenthal & Lederbogen 2008). En outre, le piétinement par le bétail favorise les zones de sol nu qui représentent les conditions optimales pour la germination des graines et le recrutement de plantules d'espèces pionnières telles que *C. palustre* (Rosenthal et al. 2012 ; Sarnneel & Soons 2012). Toutefois, le pâturage intensif d'un biotope et la forte appétence d'une espèce végétale auraient un impact négatif sur ses populations puisque les

parties aériennes permettant la reproduction sexuée et les structures végétatives permettant la persistance en conditions défavorables à la reproduction sexuée seraient endommagées. Une étude menée par Piqueras (1999) concernant l'impact du pâturage sur la persistance de *Trientalis europaea* (Primulacées) décrit un effet défavorable du pâturage sur le développement et la survie de la plante : il empêche la floraison et la fructification de *T. europaea* et augmente la mortalité des ramets au cours de l'été.

6.2.4 Recrutement de plantules

Les résultats de l'étude de la diversité génétique des populations de *C. palustre* (Chapitre 5) montrent que les individus échantillonnés présentent un coefficient de dépression de consanguinité faible ($F_{IS} = -0,03 - 0,09$) au sein des populations. Comme aucune plantule n'a été observée lors des observations de terrain, cela laisse supposer que le recrutement y est rare malgré la quantité d'akènes produites (en moyenne 153 ± 4 akènes par faux-fruit). De plus, le faible coefficient calculé pour les adultes serait probablement le résultat d'une pression de sélection sur les plantules lors du recrutement car ce coefficient est plus élevé pour les plantules (Fosse : $F_{IS} = 0,37$; Bra : $F_{IS} = 0,38$). Cette hypothèse se base sur la description des différents stades de développement de l'espèce dans la littérature. En tant qu'espèce végétale pionnière, les akènes de *C. palustre* dépendent de conditions de germination bien spécifiques décrites par Sarneel & Soons (2012) : elles semblent ne germer que sur des sols nus gorgés d'eau et en pleine lumière. En outre, *C. palustre* présente un taux de germination assez faible (en moyenne de 30% ; obs. pers.) lors des tests de germination en conditions contrôlées, ce que confirme l'étude menée par Olesen & Warncke (1992). Enfin, une pression de sélection négative sur les plantules de *C. palustre* en cas de forte densité inter- et intra-spécifique a été décrite par Kiviniemi (2001) et Sarneel & Soons (2012). A ce stade, les plantules issues d'allopollinisation seraient sans doute favorisées par rapport à celles issues d'auto-pollinisation, en particulier en conditions de concurrence ou de stress physiologique (Price & Waser 1979 ; Waller 1984). En raison des conditions particulières nécessaires au recrutement des plantules de *C. palustre*, ce recrutement serait faible et une sélection aurait lieu tout au long de leur développement. Ce type de recrutement est décrit par le modèle de « Recruitment at Windows of Opportunity » (RWO). Selon ce modèle, les événements de recrutement surviendraient au sein des populations établies à une très faible fréquence et de manière imprévisible dans le temps et dans l'espace et seraient limités par la disponibilité simultanée de graines et de microsites favorables. Malgré la rareté des événements de recrutement, nous avons déterminé qu'un clone de la population de Bra était issu de deux autres clones de la même population ce qui renforce l'hypothèse de recrutement de type RWO. Ce type de recrutement est reporté pour d'autres espèces végétales de milieux pionniers et

6.2. Reproduction sexuée et multiplication végétative de *Comarum palustre*

capables de multiplication végétative comme *Gentiana pannonica* (Gentianacées ; Ekrtová & Košnar 2012), *Knautia arvensis* (Dipsacacées ; Vange 2002), *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllacées ; Galeuchet *et al.* 2005), *Medicago sativa* ssp. *falcata* (Fabacées ; Kaljund *et al.* 2013) ou *Succisa pratensis* (Dipsacacées ; Hooftman *et al.* 2003).

Il est à noter que des perturbations, telles que les inondations, ou l'évolution naturelle des stades de succession peuvent influencer le recrutement des plantules (Broek & Beltman 2006 ; Silvertown 2008 ; Cichini *et al.* 2011 ; Araki & Kunii 2013). Les biotopes dans lesquels se retrouve *C. palustre* peuvent être soumis à des inondations régulières qui ont pour effet la dissémination des graines (Skoglund 1990 ; Baattrup-Pedersen *et al.* 2012), ainsi que la diminution de la densité de végétation, créant des zones de sol nu et l'augmentation de l'intensité lumineuse au niveau du sol, conditions favorables au recrutement des plantules. Ce mode de recrutement est décrit chez *Carex rugulosa* (Poacées) après inondation (Araki & Kunii 2013). L'étude de Skoglund 1990 décrit également l'impact positif des crues sur le recrutement de nouveaux individus d'espèces végétales, dont *C. palustre*, qui est favorisé par les graines déposées lors du retrait des eaux. Il semble que le recrutement de plantules chez *C. palustre* résulte principalement de graines âgées de moins de cinq ans puisqu'une étude de Jensen (2004) montre que les akènes de *C. palustre* forment une banque de graines conservant leur pouvoir germinatif au moins cinq ans. Par conséquent, la restauration d'un bas-marais abandonné depuis plusieurs décennies, comme celui de Stockem, et sa recolonisation par des individus de *C. palustre* serait plus probablement due à des individus maintenus au stade végétatif qu'à la banque de graines. Cette hypothèse est étayée par une étude de Jaabova *et al.* (unpubl. manuscript) sur la structure et la diversité génétique de populations de *M. trifoliata* qui rapporte la présence de quatre individus sur une surface échantillonnée de 400 m² dans ce bas-marais restauré en 2007. Pour ces espèces, le maintien d'individus au stade végétatif serait avantageux en raison de la durée de vie limitée de leur banque de graines.

6.2.5 Multiplication végétative et reproduction sexuée

Au cours de la présente étude, il a été montré que le taux d'allogamie de *C. palustre* en populations naturelles était influencé par la structure clonale au sein des populations et des plages de clones (Chapitre 5). En particulier au niveau de la population, ce taux était significativement plus élevé dans les populations dont la répartition des individus dans l'espace est homogène ($t_m = 0,83 - 0,84$) que dans celles dont les plages de clones étaient distantes d'un minimum de 25 m ($t_m = 0,46$) et de 90 m ($t_m = 0,33$). Dans ces populations discontinues, les flux de pollen se font donc majoritairement au niveau des plages de clones. Les analyses de paternité confirment d'ailleurs que les événements de pollinisation entre plages de clones

étaient de 7% lorsque distants de minimum 25 m et de 1% lorsque distants de 90 m. Les populations dont la répartition des plages de clones est discontinue présentent en effet généralement des flux de pollen faibles entre les plages de clones (Young *et al.* 1996 ; Sork *et al.* 1999). Lorsque les plages de clones sont dispersées à travers la population, les pollinisateurs tendent à rester plus longtemps dans ces plages et à y visiter un plus grand nombre de fleurs, favorisant la dispersion du pollen sur de courtes distances. Ce comportement a été décrit dans une étude de Goverde *et al.* (2002) concernant l'impact de la distance (5 m) entre plages de *Betonica officinalis* (Lamiacées) sur le comportement de visite de *Bombus veteranus*. Ce dernier tend en effet à rester plus longtemps au sein d'une plage et à y visiter plus d'inflorescences, augmentant les événements de gitonogamie et diminuant les flux de pollen entre les plages. Cette limitation dans la dispersion du pollen augmente proportionnellement avec la densité florale dans les plages de clones (Williams 2007). La faible proportion de flux de pollen entre les plages de clones les plus distantes s'explique par le fait qu'une augmentation de la distance entre les plages de clones favorise la probabilité que les pollinisateurs butinent sur d'autres espèces ou qu'ils se « nettoient », induisant la perte de pollen conspécifique.

Au niveau des plages de clones, nous avons montré que la taille des individus influençait le taux d'allogamie. Il était en effet significativement plus bas au sein des individus dont le nombre de ramets est supérieur à 100 ($t_m = 0,00 - 0,25$) que dans ceux dont ce nombre est inférieur ($t_m = 0,20 - 1,00$). Dans le cas d'espèces auto-compatibles comme *C. palustre*, l'augmentation de la taille des individus selon une stratégie d'occupation de l'espace de type « phalange » augmente la probabilité de gitonogamie au sein des clones, en particulier en leur centre. En effet, les pollinisateurs visitent généralement les fleurs de manière séquentielle de proche en proche. Ce comportement induit que les premières fleurs visitées au sein d'un clone auront plus de chances de recevoir du pollen issu d'un autre clone que les fleurs visitées par la suite (Karron *et al.* 2009). A notre connaissance, l'importance de la taille des clones n'a pas encore été mise en évidence par l'étude de la structure des clones, bien que l'influence de la taille des clones sur la reproduction sexuée et le taux d'allogamie soient évoquées dans la littérature (Barrett 2003 ; Honnay & Jacquemyn 2008). Les études décrivant l'influence de la structure clonale sur le régime de reproduction sexuée se focalisent généralement sur l'influence de l'architecture clonale, régissant la répartition spatiale des ramets, et l'influence de la diversité génotypique (Albert *et al.* 2008 ; Carrillo-Angeles *et al.* 2010 ; Vandepitte *et al.* 2013).

6.2.6 Zones relais et dispersion du pollen

Les résultats relatifs à la dispersion du pollen soulignent que dans le cas d'une population de *C. palustre* dont les individus sont répartis en plages de clones distinctes, des plages distantes de 25 à 70 m permettent la dispersion du pollen d'un

individu menant à la pollinisation effective des stigmates d'un autre individu situé à 170 m. Cette population montre une distance de dispersion du pollen similaire à celle décrite pour d'autres populations de *C. palustre* dans une étude menée par Mayer *et al.* (2012b). Une étude comparable sur la dispersion du pollen de *M. trifoliata* menée par Van Rossum *et al.* (unpubl. manuscript), rapporte quant à elle une distance de dispersion allant jusqu'à 337 m malgré une distance entre les plages de clones d'environ 200 m. Toutefois, ces deux études montrent que la majorité du pollen est déposée à proximité de l'individu source ($< 10m$), ce qui est également le cas dans les populations considérées dans la présente étude puisque les flux de pollen sont restreints aux plages de clones. Un tel patron de dispersion, dont la plupart des flux de pollen sont réalisés à courte distance avec de rares événements à longue distance, résulte de la combinaison de plusieurs facteurs dont la distribution des plages de l'espèce végétale cible, le comportement de visite des principaux pollinisateurs qui butinent les fleurs de proche en proche et qui induit un dépôt de pollen plus important à courte distance, la perte passive de pollen pendant le vol, et le transfert secondaire du pollen via sa remobilisation (Inouye *et al.* 1994 ; Kwak *et al.* 1998). La distance maximale atteinte par le pollen d'un individu peut également être influencée par la densité florale, notamment dans le cas d'espèces végétales présentant une floraison massive comme *Rhododendron ferrugineum* (Ericacées ; Escaravage & Wagner 2004) et *Vaccinium uliginosum* (Ericacées ; Van Rossum *et al.* 2013). Les plages présentant une densité et des ressources florales plus importantes sont en effet plus attractives pour les pollinisateurs qui y concentrent leurs activités de butinage (Makino *et al.* 2007), réduisant la distance parcourue par le pollen d'un individu.

Des distances de dispersion de pollen plus importantes sont rapportées dans la littérature pour des espèces également pollinisées par des Apoïdes, notamment *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllacées ; 523 m ; Van Rossum & Triest 2010), *Arabis alpina* (Brassicacées ; 1000 m ; Buehler *et al.* 2012) et *Centaurea jacea* (Astéracées ; 2600 m ; Van Rossum 2010). La composition de la matrice paysagère dans laquelle se déplacent les pollinisateurs et dont certains éléments comme les zones relais (« stepping-stones ») contenant une espèce cible ainsi que des éléments linéaires facilitent le déplacement des pollinisateurs entre les populations d'une espèce cible, pourrait augmenter la distance de dispersion du pollen conspécifique (Beier & Noss 1998 ; Aavik *et al.* 2013). Par exemple, les zones relais sont décrites comme ayant une influence positive sur la distance de dispersion du pollen de *Primula elatior* (Primulacées ; Van Rossum & Triest 2012) et de *Centaurea jacea* (Astéracées ; Van Rossum 2010). La présente étude n'a pas permis de mettre en évidence de flux de pollen entre populations. Toutefois, les deux régions d'étude font l'objet de mesures de restauration des milieux tourbeux visant à améliorer leur connectivité via l'augmentation des surfaces tourbeuses et l'abattage des pessières. Certaines populations étant distantes de moins de 1 à 1,5 km, il serait opportun de déterminer s'il existe des flux de pollen entre ces populations suite à ces mesures de restauration et quelle

serait l'influence des éléments du paysage sur la dispersion du pollen.

Chapitre 7

Conclusion

La biologie de la reproduction de *Comarum palustre* a été caractérisée au moyen d'une double approche : d'une part, l'étude des caractéristiques spatiales favorisant l'abondance des pollinisateurs majoritaires de l'espèce végétale cible et de leur réseau alimentaire ; et d'autre part l'étude du succès reproducteur et du mode de reproduction de l'espèce végétale cible.

L'étude de l'impact de la structure spatiale des populations de *C. palustre* sur ses pollinisateurs a permis de caractériser les facteurs favorables à l'abondance de ses pollinisateurs majoritaires, les bourdons et les abeilles solitaires, et d'approcher les différentes composantes de leur habitat dans les milieux tourbeux humides. A l'échelle du paysage, la diversité des éléments (forêts, bosquets, talus, prairies semi-naturelles) est favorable à l'abondance des bourdons et des abeilles solitaires dans les milieux tourbeux humides. Ces derniers représentent en effet des sites de butinage adéquats mais peu propices à la nidification des insectes terricoles en raison des fluctuations de la nappe perchée ; alors que les lisières associées aux zones boisées et les milieux semi-naturels représentent des sites de nidification et de butinage favorables. Au sein des milieux tourbeux humides, la densité des fleurs de *C. palustre* est favorable à l'abondance des espèces du genre *Bombus*, ce qui serait lié à la qualité des ressources florales (pollen et nectar) de l'espèce végétale. La présente étude montre également que les espèces du genre *Bombus* collectent du pollen sur d'autres espèces végétales dont la composition en acides aminés et en phytostérols est variable, ce qui suggère que la diversité spécifique est favorable à l'abondance des espèces du genre *Bombus*. En particulier, les espèces végétales telles que *C. palustre*, dont le pollen et le nectar sont de qualité, représentent des espèces-clés dans le réseau alimentaire des pollinisateurs. Les autres espèces végétales dont l'abondance est inférieure au sein du milieu tourbeux humide, bénéficieraient de l'attractivité de ces espèces-clés via le partage des pollinisateurs.

Au terme de la présente étude, nous pouvons également tirer plusieurs conclu-

sions concernant la persistance des populations de *C. palustre* dans un paysage fragmenté.

La qualité des ressources florales de *C. palustre* qui sont facilement accessibles en raison de la morphologie florale, induit que les fleurs sont attractives et visitées par 63 espèces d'insectes. *Comarum palustre* est donc une espèce généraliste. L'espèce est également auto-compatible permettant une fécondation des ovules quelle que soit l'origine génétique du pollen conspécifique. Ces deux traits, généraliste et auto-compatible, induisent que *C. palustre* serait moins sensible à une limitation de transfert de pollen puisqu'une faible quantité de pollen est requise pour la mise à graines. Cependant, son succès reproducteur est influencé par l'abondance et le comportement de visite de ses pollinisateurs majoritaires. Les fleurs ayant une mise à graines négligeable après autopolinisation spontanée, la perte des pollinisateurs a un impact négatif sur le succès reproducteur des individus.

La multiplication végétative par rhizomes confère l'avantage aux individus de pouvoir se maintenir lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la reproduction sexuée ou au recrutement de plantules, ainsi que de maintenir la diversité génétique des populations. La présente étude souligne que la disposition des ramets suite à la multiplication végétative ainsi que la distribution spatiale des individus de *C. palustre* dans les populations mènent à un mode de reproduction majoritairement autogame à l'échelle des plages isolées d'individus. *A contrario*, une distance réduite entre plages d'individus favorise les flux de pollen entre ces plages et peut contribuer à augmenter le taux d'allogamie ce qui favorise la diversité génétique ; alors qu'un taux d'autogamie élevé peut conduire à une faible survie des plantules et un appauvrissement de la diversité génétique. Le recrutement des plantules issues d'autogamie est soumis à une pression de sélection négative en raison d'une dépression de consanguinité aux stades précoces de développement. Cette pression de sélection a pour avantage de favoriser la diversité génétique au sein des populations.

Les résultats obtenus au cours de la présente étude suggèrent que la fragmentation des milieux tourbeux humides n'a pas un impact direct sur le succès reproducteur et la diversité génétique des populations de l'espèce végétale. En effet, la diversité génétique est élevée quelle que soit la population considérée et la richesse génotypique semble plutôt liée à l'historique de gestion des populations qu'à la taille des fragments dans lesquelles elles sont localisées. Toutefois, son succès reproducteur serait influencé par l'abondance et le comportement de visite de ses pollinisateurs majoritaires. L'abondance de ces derniers étant liée à la densité florale de l'espèce-cible, ainsi qu'à la diversité des éléments du paysage entourant ce dernier, la destruction et la fragmentation pourraient avoir une influence directe sur les insectes pollinisateurs et leurs services de pollinisation, ce qui pourrait affecter les populations végétales qui dépendent de leurs services. La présente étude confirme

donc qu'une approche multiple lors de l'étude de la biologie de la reproduction d'une espèce végétale et de l'étude de la conservation de ses populations est appropriée. En effet, l'espèce étant dépendante des pollinisateurs pour son succès reproducteur, il est important de pouvoir caractériser les facteurs favorables à la présence et l'abondance des principaux pollinisateurs de l'espèce végétale cible.

Les mesures de gestion et de restauration des milieux devraient donc non seulement mener à la conservation et la restauration des populations végétales, via l'entretien des conditions des stades de succession favorables aux espèces cibles, et la restauration des conditions hydrologiques promulguant les flux de gènes par les graines pour les espèces hydrochores et favorisant le recrutement de nouveaux individus ; mais également la conservation des insectes et de leurs services de pollinisation en favorisant les éléments du paysage et leur diversité représentant un habitat de qualité pour ces pollinisateurs.

Annexe A

Insect species observed on flowers of *Comarum palustre*

TABLE A.1: Insect species observed on flowers of *Comarum palustre* in the 14 study sites from 2010 to 2012. The following undetermined species were not included in the table : 1 Coleoptera, 2 Carabidae, 1 Calliphoridae, 1 Muscidae, 1 Syrphidae, 1 Pentatomidae, 1 Eumenidae, 1 Formicidae and 1 Orthoptera species.

Order	Family	Species
Coleoptera	Cantharidae	<i>Cantharis rustica</i>
		<i>Rhagonycha translucida</i>
	Cerambycidae	<i>Leptura rubra</i>
		<i>Pachytodes cerambyformis</i>
		<i>Stenurella nigra</i>
	Oedemeridae	<i>Oncomera femorata</i>
<i>Oedemera nobilis</i>		
Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>
		<i>Lucilia</i> sp. 1
		<i>Lucilia</i> sp. 2
	Dolichopodidae	<i>Dolichopus</i> sp.
	Muscidae	<i>Graphomya maculata</i>
		<i>Phaonia angelicae</i>
	Stratiomyidae	<i>Oplodontha viridula</i>
	Syrphidae	<i>Anasimyia lineata</i>
		<i>Eristalis tenax</i>
		<i>Helophilus pendulus</i>
		<i>Neoascia geniculata</i>
		<i>Parelophilus versicolor</i>
		<i>Rhingia campestris</i>
		<i>Sphaerophoria menthasti</i>
		<i>Sphaerophoria scripta</i>
		<i>Volucella bombylans</i>
Heteroptera	Rhopalidae	<i>Rhopalus maculatus</i>
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp. 1
		<i>Andrena</i> sp. 2
	Apidae	<i>Apis mellifera</i>
		<i>Bombus campestris</i>
		<i>Bombus hortorum</i>
		<i>Bombus hypnorum</i>
		<i>Bombus lapidarius</i>
		<i>Bombus lucorum</i>
		<i>Bombus pascuorum</i>
		<i>Bombus pratorum</i>
		<i>Bombus terrestris</i>
		<i>Bombus vestalis</i>
	<i>Bombus veteranus</i>	
	Colletidae	<i>Hylaeus biponctatus</i>
	Halictidae	<i>Lasioglossum</i> sp.
Melittidae	<i>Macropis fulvipes</i>	
Tenthredinidae	<i>Tenthredopsis litterata</i>	
Vespidae	<i>Vespula vulgaris</i>	

Lepidoptera	Hesperiidae	<i>Ochlodes venatus</i>
	Lycaenidae	<i>Polyommatus icarus</i>
	Nymphalidae	<i>Aphantopus hyperantus</i>
		<i>Boloria eunomia</i>
		<i>Boloria euphrosyne</i>
		<i>Brenthis ino</i>
		<i>Coenonympha pamphilus</i>
		<i>Maniola jurtina</i>
		<i>Melitaea diamina</i>
Pieridae	<i>Aporia crataegi</i>	
Mecoptera	Panorpidae	<i>Panorpa Communis</i>

Annexe B

Corbicular pollen load content from 58 bumble bee individuals

TABLE B.1: Plant species adundance (%) and richness in the corbicular pollen loads from 58 bumble bee individuals of four different species (*B. lapidarius* (n=12), *B. terrestris* s.l. (n=30), *B. pascuorum* (n=5) and *B. hypnorum* (n=11)). Pure pollen loads are in bold.

	<i>Comarum palustre</i>	<i>Lychnis flos-cuculi</i>	<i>Valeriana repens</i>	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Persicaria bistorta</i>	<i>Cirsium palustre</i>	<i>Ranunculus acris</i>	<i>Mimulus guttatus</i>	<i>Angelica sylvestris</i>	<i>Galium spp.</i>	<i>Centaurea jacea</i>	<i>Geranium spp.</i>	<i>Crepis paludosa</i>	<i>N_{species}</i>
<i>B. lapidarius</i>	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	99.9	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	2
	99.3	0.2	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	99.3	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	99.1	0.4	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	94.3	0.1	0.6	4.7	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	5
	80.9	1.9	-	3.8	-	-	-	6.0	-	-	-	-	-	4
	73.5	5.3	-	21.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>B. terrestris</i> s.l.	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	99.9	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	99.9	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	2
	99.9	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	99.9	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	99.5	0.2	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	99.4	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	99.3	-	0.6	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	98.6	0.2	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	94.5	-	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	93.9	-	-	-	-	0.3	5.8	-	-	-	-	-	-	3
	93.0	0.2	6.4	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	92.8	7.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	92.1	0.3	-	-	0.1	-	7.6	-	-	-	-	-	-	4
	90.8	1.1	0.4	-	-	-	-	-	7.8	-	-	-	-	4
	71.2	-	-	-	3.8	-	25.0	-	-	-	-	-	-	3
	69.1	-	15.6	-	-	-	-	15.3	-	-	-	-	-	3
	63.2	-	31.8	0.4	-	-	-	4.5	-	-	-	-	-	4
	57.3	29.6	-	-	-	-	-	12.7	0.4	-	-	-	-	4
	53.0	1.3	14.5	0.5	-	-	9.1	-	21.3	-	0.3	-	-	7
	32.1	0.5	-	0.7	-	66.6	-	-	-	-	-	-	0.2 5	
	20.3	-	79.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	9.7	6.5	-	-	77.4	-	6.5	-	-	-	-	-	4	
	1.1	-	-	-	-	-	-	-	98.9	-	-	-	2	
	1.0	99.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
	-	93.4	-	6.2	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	3
	-	72.0	-	-	2.0	-	26.0	-	-	-	-	-	-	3
	-	-	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	73.5	5.3	-	21.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3

CHAPITRE B. Corbicular pollen load content from 58 bumble bee individuals

	<i>Comarum palustre</i>	<i>Lychnis flos-cuculi</i>	<i>Valeriana repens</i>	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Persicaria bistorta</i>	<i>Cirsium palustre</i>	<i>Ranunculus acris</i>	<i>Mimulus guttatus</i>	<i>Angelica sylvestris</i>	<i>Galium spp.</i>	<i>Centaurea jacea</i>	<i>Geranium spp.</i>	<i>Crepis paludosa</i>	<i>N_{species}</i>
<i>B. pascuorum</i>	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	99.5	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	97.7	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	96.7	-	-	2.4	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	68.9	0.4	-	27.0	-	0.9	-	-	-	-	-	2.8	-	5
<i>B. hypnorum</i>	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	99.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	99.5	0.2	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	98.5	0.1	-	-	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	95.8	-	-	-	-	-	2.8	-	-	1.4	-	-	-	3
	91.2	-	-	-	8.8	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	35.3	-	0.1	-	-	0.1	-	-	64.5	-	-	-	-	4
	0.2	-	-	-	0.3	0.2	2.3	-	-	97.0	-	-	-	5
	-	-	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Annexe C

List of additional SSRs that could be further developed into markers for *Comarum palustre*

TABLE C.1: List of additional SSRs with a minimum of ten repeats (excluding the most common motif AT) and with sufficient flanking regions that could be further developed into markers. For each locus, the repeated motif and Genbank accession number are given.

Locus	Repeat	Genbank #	Locus	Repeat	Genbank #
Co-AAT1	(AAT) ₁₂	JN160847	Co-AG7	(AG) ₁₃	JN160866
Co-AAT2	(AAT) ₁₂	JN160848	Co-AG9	(AG) ₁₁	JN160867
Co-AAT3	(AAT) ₁₂	JN160849	Co-AG10	(AG) ₁₁	JN160868
Co-AAT4	(AAT) ₁₂	JN160850	Co-AG11	(AG) ₁₀	JN160869
Co-ATT1	(ATT) ₁₂	JN160851	Co-AG12	(AG) ₁₀	JN160870
Co-ATT2	(ATT) ₁₃	JN160852	Co-AG14	(AG) ₁₀	JN160871
Co-CTT1	(CTT) ₂₂	JN160853	Co-AG15	(AG) ₁₀	JN160872
Co-CTT4	(CTT) ₁₂	JN160854	Co-AG16	(AG) ₁₀	JN160873
Co-CTT5	(CTT) ₁₂	JN160855	Co-AG17	(AG) ₁₀	JN160874
Co-CTT7	(CTT) ₁₂	JN160856	Co-AG18	(AG) ₁₀	JN160875
Co-CTT13	(CTT) ₁₀	JN160857	Co-CT1	(CT) ₁₂	JN160876
Co-CTT16	(CTT) ₁₀	JN160858	Co-CT2	(CT) ₁₂	JN160877
Co-AC2	(AC) ₁₄	JN160859	Co-CT3	(CT) ₁₃	JN160878
Co-AC3	(AC) ₁₁	JN160860	Co-CT5	(CT) ₁₁	JN160879
Co-AC6	(AC) ₁₀	JN160861	Co-CT6	(CT) ₁₀	JN160880
Co-AC7	(AC) ₁₀	JN160862	Co-CT9	(CT) ₁₀	JN160881
Co-AC8	(AC) ₁₀	JN160863	Co-GT2	(GT) ₁₂	JN160882
Co-AG1	(AG) ₁₇	JN160864	Co-GT3	(GT) ₁₂	JN160883
Co-AG6	(AG) ₁₂	JN160865	Co-GT4	(GT) ₁₀	JN160884

Annexe D

Productions scientifiques issues de la thèse

D.1 Participation à des symposiums et congrès

D.1.1 Participation active

1. Somme, L., Mayer, C. et Jacquemart, A.-L. 2009. Effect of population size on reproductive success and pollinator guild of *Comarum palustre* (Rosaceae). Young Botanist Days, 24 et 25 novembre, ULB, Bruxelles. Communication orale.
2. Somme, L., Mayer, C. et Jacquemart, A.-L. 2010. Effects of population size on pollinator guild, reproductive success and long term persistence of *Comarum palustre* (Rosaceae). GFOe meeting, 30 août au 3 septembre, Giessen, Allemagne. Communication orale.
3. Somme, L., Mayer, C. et Jacquemart, A.-L. 2010. Plant-pollinator interactions : effects of population size on long term sustainability of a bog species, *Comarum palustre* (Rosaceae). Scandinavian Association of Pollination Ecology (SCAPE), 21 au 24 octobre, Tovetorp station, Suède. Communication orale.
4. Somme, L., Jacquemart, A.-L., Mayer, C., Leprince, N., Brédard, E., Michez, D. et Van Rossum, F. 2011. Pollen dispersal pattern assessment in four insect-pollinated bog species. Scandinavian Association of Pollination Ecology (SCAPE), 27 au 30 octobre, Vingsted, Danemark. Communication orale.
5. Somme, L., Mayer, C. et Jacquemart, A.-L. 2011. Forest edges influence bumble bee assemblages in populations of *Comarum palustre* (Rosaceae). Young Botanist Days, 2 décembre, KUL, Leuven. Poster.

D.2. Travail de fin d'études

6. Somme, L., Raabová, J., Jacquemart, A.-L., and Raspé, O. 2012. Development and multiplexing of microsatellite markers using pyrosequencing in the clonal plant *Comarum palustre* (Rosaceae). Vienna International Plant Conference Association (VIPCA) - Molecular Ecology session, 6 au 10 février, Vienne, Autriche. Poster.
7. Somme, L., Mayer, C. et Jacquemart, A.-L. 2013. Impacts de la structure spatiale sur la pollinisation du comaret (*Comarum palustre* L.) suivant une approche multiscalaire. Ecoveg9 - Colloque d'écologie des communautés, 3 au 5 avril, Université François Rabelais, Tours, France. Communication orale.

D.1.2 Participation passive

1. « Aspects méconnus de la diversité Botanique et Microbienne ». Société Botanique de France, 6 novembre 2010, Faculté de médecine, Paris VI^e, France.
2. « Arbres d'alignement en ville, vecteurs de biodiversité ». Apis Bruoc Sella, 15 mars 2012, Facultés universitaires Saint-Louis, Bruxelles.
3. « Les arbres ont-ils droit de cité ? » 28 mai 2013, Parlement de la région de Bruxelles-Capitale, Bruxelles.
4. Semaine européenne de l'Abeille et de la Pollinisation. 5 juin 2013. Parlement Européen, Bruxelles.
5. « L'abeille, indicateur des écosystèmes ». Semaine européenne de l'Abeille et de la Pollinisation, 6 juin 2013. Institut royal des sciences naturelles de Belgique, Bruxelles.

D.2 Travail de fin d'études

1. Lombaerde, I., 2013. Analyse nutritionnelle des ressources florales du réseau de pollinisation de *Comarum palustre* L. (Rosacées). Bio-ingénieur, UCL. p. 105.

Bibliographie

- Aavik, T., Holderegger, R., Edwards, P.J. & Billeter, R. (2013). Patterns of contemporary gene flow suggest low functional connectivity of grasslands in a fragmented agricultural landscape. *Journal of Applied Ecology*, 50, 395–403.
- Abdelkrim, J., Robertson, B., Stanton, J.A. & Gemmell, N. (2009). Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques*, 46, 185–192.
- Adler, L.S. (2000). The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*, 91, 409–420.
- Adler, P., Raff, D. & Lauenroth, W. (2001). The effect of grazing on the spatial heterogeneity of vegetation. *Oecologia*, 128, 465–479.
- Aerts, R., Verhoeven, J.T.A. & Whigham, D.F. (1999). Plant-mediated controls on nutrient cycling in temperate fens and bogs. *Ecology*, 80, 2170–2181.
- Agren, J., Ehrlén, J. & Solbreck, C. (2008). Spatio-temporal variation in fruit production and seed predation in a perennial herb influenced by habitat quality and population size. *Journal of Ecology*, 96, 334–345.
- Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L. & Aizen, M.A. (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation : review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, 9, 968–980.
- Aguilar, R., Quesada, M., Ashworth, L., Herrerias-Diego, Y. & Lobo, J. (2008). Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations : susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17, 5177–5188.
- Aiken, S., Dallwitz, M., Consaul, L., McJannet, C., Gillespie, L., Boles, R., Argus, G., Gillett, J., Scott, P., Elven, R., LeBlanc, M., Brysting, A. & Solstad, H. (2003). Flora of the Canadian Arctic Archipelago : descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. version : 29th april 2003.
- Aizen, M.A. (2001). Flower sex ratio, pollinator abundance, and the seasonal pollination dynamics of a protandrous plant. *Ecology*, 82, 127–144.

- Aizen, M.A. & Harder, L.D. (2007). Expanding the limits of the pollen-limitation concept : effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, 88, 271–281.
- Albaladejo, R.G., Carrillo, L.F., Aparicio, A., Fernández-Manjarrés, J.F. & González-Varo, J.P. (2009). Population genetic structure in *Myrtus communis* L. in a chronically fragmented landscape in the Mediterranean : can gene flow counteract habitat perturbation ? *Plant Biology*, 11, 442–453.
- Albert, T., Raspé, O. & Jacquemart, A.L. (2004). Clonal diversity and genetic structure in *Vaccinium myrtillus* populations from different habitat. *Belgian Journal of Botany*, 137, 155–162.
- Albert, T., Raspé, O. & Jacquemart, A.L. (2005). Diversity and spatial structure of clones in *Vaccinium uliginosum* populations. *Canadian Journal of Botany*, 83, 211–218.
- Albert, T., Raspé, O. & Jacquemart, A.L. (2008). Influence of clonal growth on selfing rate in *Vaccinium myrtillus* L. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 10, 643–649.
- Allaby, M. (2010). *A dictionary of Ecology*. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Alphandéry, P. & Fortier, A. (2001). Can a territorial policy be based on science alone ? The system for creating the Natura 2000 network in France. *Sociologia Ruralis*, 41, 311–328.
- Araki, S. & Kunii, H. (2013). Conditions for seedling establishment and probable function of seed in the clonal sedge *Carex rugulosa* Kük. in riverside marshes. *Plant Species Biology*, 28, 12–20.
- Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Al Farhan, A.H., Al Homaidan, A.A., Bahkali, A.H., Al Sadoon, M. & Shobrak, M. (2010). A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 2079–2096.
- Arnaud-Haond, S. & Belkhir, K. (2007). Genclone : a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes*, 7, 15–17.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C.M., Alberto, F. & Serrão, E.A. (2007). Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, 16, 5115–5139.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C.M., Diaz-Almela, E., Marbá, N., Sintes, T. & Serrão, E.A. (2012). Implications of extreme life span in clonal organisms : millenary clones in meadows of the threatened seagrass *Posidonia oceanica*. *PLoS ONE*, 7, e30454.

BIBLIOGRAPHIE

- Artz, D.R. & Waddington, K.D. (2006). The effects of neighbouring tree islands on pollinator density and diversity, and on pollination of a wet prairie species, *Asclepias lanceolata* (Apocynaceae). *Journal of Ecology*, 94, 597–608.
- Ashman, T.L., Knight, T.M., Steets, J.A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D.R., Dudash, M.R., Johnston, M.O., Mazer, S.J., Mitchell, R.J., Morgan, M.T. & Wilson, W.G. (2004). Pollen limitation of plant reproduction : Ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85, 2408–2421.
- Ashworth, L., Aguilar, R., Galetto, L. & Aizen, M.A. (2004). Why do pollination generalist and specialist plant species show similar reproductive susceptibility to habitat fragmentation ? *Journal of Ecology*, 92, 717–719.
- Austin, J.E., Keough, J.R. & Pyle, W.H. (2007). Effects of habitat management treatments on plant community composition and biomass in a montane wetland. *Wetlands*, 27, 570–587.
- Baatrup-Pedersen, A., Dalkvist, D., Dybkjaer, J.B., Riis, T., Larsen, S.E. & Kronvang, B. (2012). Species recruitment following flooding, sediment deposition and seed addition in restored riparian areas. *Restoration Ecology*, pp. 399–408.
- Baguette, M., Blanchet, S., Legrand, D., Stevens, V.M. & Turlure, C. (2013). Individual dispersal, landscape connectivity and ecological networks. *Biological Reviews*, 88, 310–326.
- Baker, H.G. (1955). Self-compatibility and establishment after 'long-distance' dispersal. *Evolution*, 9, 347–349.
- Baker, H.G. & Baker, I. (1990). The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany*, 39, 157–166.
- Barrett, S.C. (1998). The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science*, 3, 335–341.
- Barrett, S.C.H. (2003). Mating strategies in flowering plants : the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 358, 991–1004.
- Bartomeus, I., Ascher, J.S., Wagner, D., Danforth, B.N., Colla, S., Kornbluth, S. & Winfree, R. (2011). Climate-associated phenological advances in bee pollinators and bee-pollinated plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Bartomeus, I., Vila, M. & Steffan-Dewenter, I. (2010). Combined effects of *Impatiens glandulifera* invasion and landscape structure on native plant pollination. *Journal of Ecology*, 98, 440–450.

- Baskin, J.M. & Baskin, C.C. (1990). Role of temperature and light in the germination ecology of buried seeds of *Potentilla recta*. *Annals of Applied Biology*, 117, 611–616.
- Behmer, S.T. & Nes, D. (2003). Insect sterol nutrition and physiology : a global overview. In : *Advances in Insect Physiology*. Elsevier, vol. 31, pp. 1–72.
- Beier, P. & Noss, R.F. (1998). Do habitat corridors provide connectivity ? *Conservation Biology*, 12, 1241–1252.
- Bender, D.J., Contreras, T.A. & Fahrig, L. (1998). Habitat loss and population decline : a meta-analysis of the patch size effect. *Ecology*, 79, 517–533.
- Benton, T. (2006). *Bumblebees : the natural history & identification of the species found in Britain*. Collins, London.
- Bergamini, A., Peintinger, M., Fakheran, S., Moradi, H., Schmid, B. & Joshi, J. (2009). Loss of habitat specialists despite conservation management in fen remnants 1995-2006. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 11, 65–79.
- Bertsch, A. (1983). Nectar production of *Epilobium angustifolium* L. at different air humidities : nectar sugar in individual flowers and the optimal foraging theory. *Oecologia*, 59, 40–48.
- Beug, H.J. (2004). *Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete*. Friedrich Pfeil, München, Germany.
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J. & Kunin, W.E. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313, 351–354.
- Biesmeijer, J.C., Sorensen, P.B. & Carvalheiro, L.G. (2011). How Pollination Ecology research can help answer important questions. *Journal of Pollination Ecology*, 4, 68–73.
- Bobbink, R. & Roelofs, J.G.M. (1995). Nitrogen critical loads for natural and semi-natural ecosystems : the empirical approach. *Water, Air, and Soil Pollution*, 85, 2413–2418.
- Bolker, B.M., Brooks, M.E., Clark, C.J., Geange, S.W., Poulsen, J.R., Stevens, M.H.H. & White, J.S.S. (2009). Generalized linear mixed models : a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 127–135.
- Bournérias, M., Arnal, G. & Bock, C. (2001). *Guide des groupements végétaux de la Région Parisienne*. Belin.

BIBLIOGRAPHIE

- Broek, T.V.d. & Beltman, B. (2006). Germination and seedling survival in fens undergoing succession. *Plant Ecology*, 185, 221–237.
- Brook, B.W., Sodhi, N.S. & Ng, P.K.L. (2003). Catastrophic extinctions follow deforestation in Singapore. *Nature*, 424, 420–426.
- Brookfield, J.F.Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5, 453–455.
- Brooks, T.M., Pimm, S.L. & Oyugi, J.O. (1999). Espacio temporal entre la deforestación y la extinción de especies de aves en fragmentos de bosques tropicales. *Conservation Biology*, 13, 1140–1150.
- Brosi, B.J., Daily, G.C., Shih, T.M., Oviedo, F. & Durán, G. (2008). The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside. *Journal of Applied Ecology*, 45, 773–783.
- Brück, L. (2006). *La périurbanisation en Belgique : comprendre le processus de l'étalement urbain*. Fédération des Professeurs de Géographie, Bruxelles.
- Buehler, D., Graf, R., Holderegger, R. & Gugerli, F. (2011). Using the 454 pyrosequencing-based technique in the development of nuclear microsatellite loci in the alpine plant *Arabis alpina* (Brassicaceae). *American journal of botany*, 98, e103–105.
- Buehler, D., Graf, R., Holderegger, R. & Gugerli, F. (2012). Contemporary gene flow and mating system of *Arabis alpina* in a Central European alpine landscape. *Annals of Botany*, p. mcs066.
- Burd, M. (1994). Bateman's principle and plant reproduction : the role of pollen limitation in fruit and seed set. *Botanical Review*, 60, 83–139.
- Burgess, V., Kelly, D., Robertson, A. & Ladley, J. (2006). Positive effects of forest edges on plant reproduction : literature review and a case study of bee visitation to flowers of *Peraxilla tetrapetala* (Loranthaceae). *New Zealand Journal of Ecology*, 30, 179–190.
- Cameron, S.A., Lozier, J.D., Strange, J.P., Koch, J.B., Cordes, N., Solter, L.F. & Griswold, T.L. (2011). Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 662–667.
- Camus, A. (1921). *Les fleurs des marais, des tourbières, des cours d'eau, des lacs et des étangs : plantes palustres et aquatiques*. Lechevalier, Paris, France.
- Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Karnas, K.J., Pennington, J.E. & Wells, M.A. (2001). Fat metabolism in insects. *Annual Review of Nutrition*, 21, 23–46.

- Cane, J. (2001). Habitat fragmentation and native bees : a premature verdict ? *Conservation Ecology*, 5, U149–U161.
- Carrillo-Angeles, I.G., Mandujano, M.C. & Golubov, J. (2010). Influences of the genetic neighborhood on ramet reproductive success in a clonal desert cactus. *Population Ecology*, 53, 449–458.
- Cartar, R.V. & Dill, L.M. (1990). Why are bumble bees risk-sensitive foragers ? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 26, 121–127.
- Carter, C., Shafir, S., Yehonatan, L., Palmer, R.G. & Thornburg, R. (2006). A novel role for proline in plant floral nectars. *Naturwissenschaften*, 93, 72–79.
- Carvalho, L.G., Kunin, W.E., Keil, P., Aguirre-Gutiérrez, J., Ellis, W.N., Fox, R., Groom, Q., Hennekens, S., Van Landuyt, W., Maes, D., Van de Meutter, F., Michez, D., Rasmont, P., Ode, B., Potts, S.G., Reemer, M., Roberts, S.P.M., Schaminée, J., WallisDeVries, M.F. & Biesmeijer, J.C. (2013). Species richness declines and biotic homogenisation have slowed down for NW-European pollinators and plants. *Ecology Letters*, pp. 870–878.
- Carvell, C. (2002). Habitat use and conservation of bumblebees (*Bombus* spp.) under different grassland management regimes. *Biological Conservation*, 103, 33–49.
- Carvell, C., Meek, W.R., Pywell, R.F. & Nowakowski, M. (2004). The response of foraging bumblebees to successional change in newly created arable field margins. *Biological Conservation*, 118, 327–339.
- Carvell, C., Osborne, J.L., Bourke, A.F.G., Freeman, S.N., Pywell, R.F. & Heard, M.S. (2011). Bumble bee species' responses to a targeted conservation measure depend on landscape context and habitat quality. *Ecological Applications*, 21, 1760–1771.
- Carvell, C., Rothery, P., Pywell, R.F. & Heard, M.S. (2008). Effects of resource availability and social parasite invasion on field colonies of *Bombus terrestris*. *Ecological Entomology*, 33, 321–327.
- Carvell, C., Roy, D., Smart, S., Pywell, R., Preston, C. & Goulson, D. (2006a). Declines in forage availability for bumblebees at a national scale. *Biological Conservation*, 132, 481–489.
- Carvell, C., Westrich, P., Meek, W.R., Pywell, R.F. & Nowakowski, M. (2006b). Assessing the value of annual and perennial forage mixtures for bumblebees by direct observation and pollen analysis. *Apidologie*, 37, 326–340.
- Castro, S., Silveira, P. & Navarro, L. (2008). Consequences of nectar robbing for the fitness of a threatened plant species. *Plant Ecology*, 199, 201–208.

BIBLIOGRAPHIE

- Catteau, E. & Duhamel, F.c. (2000). *Guide des végétations des zones humides de la Région du Nord-Pas de Calais*. Bailleul.
- Cawoy, V., Jonard, M., Mayer, C. & Jacquemart, A.L. (2012). Do abundance and proximity of the alien *Impatiens glandulifera* affect pollination and reproductive success of two sympatric co-flowering native species ? *Journal of Pollination Ecology*, 10.
- Chapman, R.F. (1998). *The insects : structure and function*. Cambridge University Press.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 237–268.
- Charpentier, A. (2001). Consequences of clonal growth for plant mating. *Evolutionary Ecology*, 15, 521–530.
- Chittka, L., Gumbert, A. & Kunze, J. (1997). Foraging dynamics of bumble bees : correlates of movements within and between plant species. *Behavioral Ecology*, 8, 239–249.
- Chittka, L. & Schürkens, S. (2001). Successful invasion of a floral market. *Nature*, 411, 653–653.
- Cichini, K., Schwienbacher, E., Marcante, S., Seeber, G.U.H. & Erschbamer, B. (2011). Colonization of experimentally created gaps along an alpine successional gradient. *Plant Ecology*, 212, 1613–1627.
- Cnaani, J., Thomson, J. & Papaj, D. (2006). Flower choice and learning in foraging bumblebees : Effects of variation in nectar volume and concentration. *Ethology*, 112, 278–285.
- Cohen, A.C. (2004). *Insect diets : science and technology*. CRC Press, Boca Raton.
- Colasse, S. (1998). *Lagland et ses richesses*. Imprimerie des Forces Armées.
- Collectif (2001). *Rapport final de la subvention 2000. Thème 2 : Gestion de la mobilité et de la multimodalité. Tome 1 : Le transport ferroviaire*. Ministère de la Région wallonne - Conférence Permanente du Développement Territorial.
- Collectif (2002). *Ecologie des Tourbières du Québec Labrador*. Pu Laval Presse Univers.
- Comba, L., Corbet, S.A., Hunt, L. & Warren, B. (1999). Flowers, nectar and insect visits : evaluating British plant species for pollinator-friendly gardens. *Annals of Botany*, 83, 369 –383.

- Connop, S., Hill, T., Steer, J. & Shaw, P. (2010). The role of dietary breadth in national bumblebee (*Bombus*) declines : Simple correlation ? *Biological Conservation*, 143, 2739–2746.
- Cook, S.M., Awmack, C.S., Murray, D.A. & Williams, I.H. (2003). Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition ? *Ecological Entomology*, 28, 622–627.
- Corbet, S.A. (2003). Nectar sugar content : estimating standing crop and secretion rate in the field. *Apidologie*, 34, 1–10.
- Couillard, L. & Payette, S. (1985). Evolution holocène d'une tourbière à pergélisol (Québec nordique). *Canadian Journal of Botany*, 63, 1104–1121.
- Craft, C., Krull, K. & Graham, S. (2007). Ecological indicators of nutrient enrichment, freshwater wetlands, Midwestern United States (U.S.). *Ecological Indicators*, 7, 733–750.
- Cristofoli, S. & Mahy, G. (2010). Ecological restoration : Context, constraints, and indicators. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 14, 203–211.
- Csencsics, D., Brodbeck, S. & Holderegger, R. (2010). Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *The Journal of heredity*, 101, 789–793.
- Cubizolle, H., Thebaud, G., Seytre, L., Porteret, J. & Tourman, A. (2010). Les causes du développement de l'arbre sur les tourbières du Massif Central oriental (France) au cours du XXème siècle. *Annales scientifiques de la réserve de Biosphère transfrontalière Vosges du Nord-Pfläzerwald*, 15, 140–170.
- Damblon, F. (1994). Les dépôts tourbeux et l'histoire de la végétation sur le plateau des Hautes-Fagnes (Belgique). *Annales de la Société géologique de Belgique*, 117, 259–276.
- Dauber, J., Biesmeijer, J.C., Gabriel, D., Kunin, W.E., Lamborn, E., Meyer, B., Nielsen, A., Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Söber, V., Settele, J., Steffan-Dewenter, I., Stout, J.C., Teder, T., Tscheulin, T., Vivarelli, D. & Petanidou, T. (2010). Effects of patch size and density on flower visitation and seed set of wild plants : a pan-European approach. *Journal of Ecology*, 98, 188–196.
- Davis, S.L. & Turner-Jones, L. (2008). Potential for mixed mating in the protandrous perennial *Saponaria officinalis* (Caryophyllaceae). *Plant Species Biology*, 23, 183–191.

BIBLIOGRAPHIE

- Day, S., Beyer, R., Mercer, A. & Odgen, S. (1990). The nutrient composition of honeybee-collected pollen in Otago, New Zealand. *Journal of apicultural research.*, 29, 138–146.
- De Groot, A.P. (1953). Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Physiol. Comp. Oecologia*, 3, 197–285.
- Debinski, D. & Holt, R. (2000). A survey and overview of habitat fragmentation experiments. *Conservation Biology*, 14, 342–355.
- Decleer, K. (2008). *Ecological Restoration in Flanders (Belgium)*. Instituut voor natuur-en bosonderzoek - INBO edn. INBO.M.2008.04. Kris Decleer.
- Diaz-Forero, I., Kuusemets, V., Mänd, M., Liivamägi, A., Kaart, T. & Luig, J. (2011). Effects of forest habitats on the local abundance of bumblebee species : a landscape-scale study. *Baltic Forestry*, 17, 235–242.
- Doak, D.F., Marino, P.C. & Kareiva, P.M. (1992). Spatial scale mediates the influence of habitat fragmentation on dispersal success : implications for conservation. *Theoretical Population Biology*, 41, 315–336.
- Dorken, M.E. & Eckert, C.G. (2001). Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology*, 89, 339–350.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Drayton, B. & Primack, R.B. (1996). Plant species lost in an isolated conservation area in Metropolitan Boston from 1894 to 1993. *Conservation Biology*, 10, 30–39.
- Dubut, V., Grenier, R., Megléc, E., Chappaz, R., Costedoat, C., Danancher, D., Descloux, S., Malausa, T., Martin, J.F., Pech, N. & Gilles, A. (2010). Development of 55 novel polymorphic microsatellite loci for the critically endangered *Zingel asper* L. (Actinopterygii : Perciformes : Percidae) and cross-species amplification in five other percids. *European Journal of Wildlife Research*, 56, 931–938.
- Dufrêne, M. (2004). Le réseau NATURA 2000 en région wallonne : stratégies, réseau écologique et mise en oeuvre. *Chaire Tractebel-Environnement 2004 - Biodiversité ; Etat, enjeux et perspectives.*, pp. 167–186.
- Dufrêne, M. & Legendre, P. (1997). Species assemblages and indicator species : the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67, 345–366.
- Dunne, J.A., Williams, R.J. & Martinez, N.D. (2002). Network structure and biodiversity loss in food webs : robustness increases with connectance. *Ecology Letters*, 5, 558–567.

- Duran, C., Appleby, N., Edwards, D. & Batley, J. (2009). Molecular genetic markers : discovery, applications, data storage and visualisation. *Current Bioinformatics*, 4, 16–27.
- Eckert, C.G. (2000). Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology*, 81, 532–542.
- Ehrlén, J. & Lehtilä, K. (2002). How perennial are perennial plants ? *Oikos*, 98, 308–322.
- Ekrtová, E. & Košnar, J. (2012). Habitat-related variation in seedling recruitment of *Gentiana pannonica*. *Acta Oecologica*, 45, 88–97.
- Ellington, C.P., Machin, K.E. & Casey, T.M. (1990). Oxygen consumption of bumblebees in forward flight. *Nature*, 347, 472–473.
- Elliott, S.E. & Irwin, R.E. (2009). Effects of flowering plant density on pollinator visitation, pollen receipt, and seed production in *Delphinium barbeyi* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 96, 912–919.
- Ellstrand, N.C. & Elam, D.R. (1993). Population genetic consequences of small population size : Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 217–242.
- Erdtman, G. (1960). The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 54, 561–564.
- Eriksson, O. (1989). Seedling dynamics and life histories in clonal plants. *Oikos*, 55, 231–238.
- Eriksson, O. (1993). Dynamics of genets in clonal plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 8, 313–316.
- Eriksson, T., Hibbs, M.S., Yoder, A.D., Delwiche, C.F. & Donoghue, M.J. (2003). The phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the TRNL/F region of chloroplast DNA. *International Journal of Plant Sciences*, 164, 197–211.
- Escaravage, N. & Wagner, J. (2004). Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biology*, 6, 606–615.
- Ewers, R.M., Bartlam, S. & Didham, R.K. (2012). Altered species interactions at forest edges : contrasting edge effects on bumble bees and their phoretic mite loads in temperate forest remnants. *Insect Conservation and Diversity*, pp. 598–606.

BIBLIOGRAPHIE

- Fabian, Y., Sandau, N., Bruggisser, O.T., Aebi, A., Kehrli, P., Rohr, R.P., Naisbit, R.E. & Bersier, L.F. (2013). The importance of landscape and spatial structure for hymenopteran-based food webs in an agro-ecosystem. *Journal of Animal Ecology*, 82, 1203–1214.
- Fahrig (2002). Effect of habitat fragmentation on the extinction threshold : a synthesis. *Ecological Applications*, 12, 346–353.
- Fahrig, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 487–515.
- Faircloth, B.C. (2008). Msatcommander : detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular ecology resources*, 8, 92–94.
- Farwig, N., Bailey, D., Bochud, E., Herrmann, J.D., Kindler, E., Reusser, N., Schüepp, C. & Schmidt-Entling, M.H. (2009). Isolation from forest reduces pollination, seed predation and insect scavenging in Swiss farmland. *Landscape Ecology*, 24, 919–927.
- Ferrari, S. & Cribari-Neto, F. (2004). Beta regression for modelling rates and proportions. *Journal of Applied Statistics*, 31, 799–815.
- Fiedler, A.K., Landis, D.A. & Arduser, M. (2012). Rapid shift in pollinator communities following invasive species removal. *Restoration Ecology*, 20, 593–602.
- Fitzpatrick, n., Murray, T.E., Paxton, R.J., Breen, J., Cotton, D., Santorum, V. & Brown, M.J. (2007). Rarity and decline in bumblebees - A test of causes and correlates in the Irish fauna. *Biological Conservation*, pp. 185–194.
- Fontaine, C., Collin, C.L. & Dajoz, I. (2008). Generalist foraging of pollinators : diet expansion at high density. *Journal of Ecology*, 96, 1002–1010.
- Forup, M.L., Henson, K.S.E., Craze, P.G. & Memmott, J. (2008). The restoration of ecological interactions : plant-pollinator networks on ancient and restored heathlands. *Journal of Applied Ecology*, 45, 742–752.
- Frankard, P. (2004). Bilan de 12 années de gestion conservatoire des tourbières hautes dans la réserve naturelle domaniale des Hautes-Fagnes (Est de la Belgique). *Géocarrefour*, 79, 269–276.
- Frankard, P. (2006). Les potentialités d'accueil de la vie sauvage en milieux humides et aquatiques : les milieux tourbeux - dossier scientifique réalisé dans le cadre de l'élaboration du rapport analytique 2006-2007 sur l'état de l'environnement wallon.
- Frankard, P., Ghiette, P., Hindryckx, M.N., Schumacker, R. & Wastiaux, C. (1998). Peatlands of Wallony (S-Belgium). *Suoseura - Finnish Peatland Society*, 49, 33–47.

- Frankham, R., Briscoe, D.A. & Ballou, J.D. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Galeuchet, D.J., Perret, C. & Fischer, M. (2005). Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flos-cuculi* L., in a fragmented landscape. *Molecular Ecology*, 14, 991–1000.
- Gardener, M.C. & Gillman, M.P. (2001). Analyzing variability in nectar amino acids : composition is less variable than concentration. *Journal of chemical ecology*, 27, 2545–2558.
- Gathmann, A. & Tscharnkte, T. (2002). Foraging ranges of solitary bees. *Journal of Animal Ecology*, 71, 757–764.
- Génissel, A., Aupinel, P., Bressac, C., Tasei, J.N. & Chevrier, C. (2002). Influence of pollen origin on performance of *Bombus terrestris* micro-colonies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104, 329–336.
- Ghazoul, J. (2005). Buzziness as usual ? Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 367–373.
- Ghazoul, J. (2006). Floral diversity and the facilitation of pollination. *Journal of Ecology*, 94, 295–304.
- Gibbs, J.P. (2000). Pérdida de humedales y conservación de la biodiversidad. *Conservation Biology*, 14, 314–317.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O. & Raine, N.E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491, 105–108.
- Given, D.R. (1994). *Principles and practice of plant conservation*. Timber Press, Portland, Or.
- Gołdyn, H. (2010). Changes in plant species diversity of aquatic ecosystems in the agricultural landscape in West Poland in the last 30 years. *Biodiversity and Conservation*, 19, 61–80.
- Gonzalez, A. (2000). Community relaxation in fragmented landscapes : the relation between species richness, area and age. *Ecology Letters*, 3, 441–448.
- Gonzalez-Teuber, M. & Heil, M. (2009). Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 809–813.
- González-Varo, J.P., Arroyo, J. & Aparicio, A. (2009). Effects of fragmentation on pollinator assemblage, pollen limitation and seed production of Mediterranean myrtle (*Myrtus communis*). *Biological Conservation*, 142, 1058–1065.

BIBLIOGRAPHIE

- Goodwillie, C., Kalisz, S. & Eckert, C.G. (2005). The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants : occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, 47–79.
- Goslee, S. & Urban, D. (2007). The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software*, 22, 1–19.
- Goulson, D. (2009). *Bumblebees : Behaviour, Ecology, and Conservation*. 2nd edn. Oxford University Press, USA.
- Goulson, D. & Darvill, B. (2004). Niche overlap and diet breadth in bumblebees ; are rare species more specialized in their choice of flowers ? *Apidologie*, 35, 9.
- Goulson, D., Hanley, M.E., Darvill, B. & Ellis, J.S. (2006). Biotope associations and the decline of bumblebees (*Bombus* spp.). *Journal of Insect Conservation*, 10, 95–103.
- Goulson, D., Hughes, W., Derwent, L. & Stout, J. (2002). Colony growth of the bumblebee, *Bombus terrestris*, in improved and conventional agricultural and suburban habitats. *Oecologia*, 130, 267–273.
- Goulson, D., Lepais, O., O'Connor, S., Osborne, J.L., Sanderson, R.A., Cussans, J., Goffe, L. & Darvill, B. (2010). Effects of land use at a landscape scale on bumblebee nest density and survival. *Journal of Applied Ecology*, 47, 1207–1215.
- Goulson, D., Lye, G.C. & Darvill, B. (2008a). Decline and conservation of bumble bees. *Annual review of entomology*, 53, 191–208.
- Goulson, D., Lye, G.C. & Darvill, B. (2008b). Diet breadth, coexistence and rarity in bumblebees. *Biodiversity and Conservation*, 17, 3269–3288.
- Goverde, M., Schweizer, K., Baur, B. & Erhardt, A. (2002). Small-scale habitat fragmentation effects on pollinator behaviour : experimental evidence from the bumblebee *Bombus veteranus* on calcareous grasslands. *Biological Conservation*, 104, 293–299.
- Grindeland, J.M., Sletvold, N. & Ims, R.A. (2005). Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*. *Functional Ecology*, 19, 383–390.
- Grootjans, A., Van Diggelen, R. & Wheeler, B.D. (1995). Assessing the restoration prospects of degraded fens. In : *Restoration of temperate wetlands*. Wiley, pp. 73–90.
- Groppe, K., Steinger, T., Schmid, B., Baur, B. & Boller, T. (2001). Effects of habitat fragmentation on choke disease (*Epichloë bromicola*) in the grass *Bromus erectus*. *Journal of Ecology*, 89, 247–255.

- Gruter, C. & Ratnieks, F.L. (2011). Flower constancy in insect pollinators. *Communicative & Integrative Biology*, 4, 633–636.
- Guillén, A., Rico, E. & Castroviejo, S. (2005). Reproductive biology of the iberian species of *Potentilla* L. (Rosaceae). *Reproductive Biology*, 62(1), 9–21.
- Guillitte, O. (2004). La fragmentation, une des causes principales de la perte de biodiversité en wallonie. *Chaire Tractebel-Environnement 2004 - Biodiversité ; Etat, enjeux et perspectives.*, pp. 101–108.
- Hagbery, J. & Nieh, J.C. (2012). Individual lifetime pollen and nectar foraging preferences in bumble bees. *Naturwissenschaften*, 99, 821–832.
- Haider, M., Dorn, S. & Müller, A. (2013). Intra- and interpopulational variation in the ability of a solitary bee species to develop on non-host pollen : implications for host range expansion. *Functional Ecology*, 27, 255–263.
- Haig, D. & Westoby, M. (1988). On limits to seed production. *American Naturalist*, 131, 757–759.
- Hall, T. (1999). BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hambuckers, A., Schumacker, R., Remacle, J. & Frankard, P. (1995). La présence de groupements végétaux à caractère mésotrophe au milieu des tourbières des Hautes-Fagnes (Belgique) est-elle liée à des intrusions de tonalité dans les couches Reviniennes. *Belgian Journal of Botany*, 128, 48–56.
- Hamelin, L.E. (1957). Les tourbières réticulées du Québec-Labrador subarctique : interprétation morphoclimatique. *Cahiers de géographie du Québec*, 2, 87.
- Hanley, M.E., Franco, M., Pichon, S., Darvill, B. & Goulson, D. (2008). Breeding system, pollinator choice and variation in pollen quality in British herbaceous plants. *Functional Ecology*, 22, 592–598.
- Harder, L.D. (1986). Effects of nectar concentration and flower depth on flower handling efficiency of bumble bees. *Oecologia*, 69, 309–315.
- Hardy, O.J., González-Martínez, S.C., Fréville, H., Boquien, G., Mignot, A., Colas, B. & Olivieri, I. (2004). Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae) I. Pattern of pollen dispersal. *Journal of Evolutionary Biology*, 17, 795–806.
- Hargreaves, A.L., Harder, L.D. & Johnson, S.D. (2009). Consumptive emasculation : the ecological and evolutionary consequences of pollen theft. *Biological Reviews*, 84, 259–276.

BIBLIOGRAPHIE

- Hatfield, R. & LeBuhn, G. (2007). Patch and landscape factors shape community assemblage of bumble bees, *Bombus* spp. (Hymenoptera : Apidae), in montane meadows. *Biological Conservation*, 139, 150–158.
- Hedberg, P., Kotowski, W., Saetre, P., Mälson, K., Rydin, H. & Sundberg, S. (2012). Vegetation recovery after multiple-site experimental fen restorations. *Biological Conservation*, 147, 60–67.
- Hegland, S.J., Nielsen, A., Lázaro, A., Bjerknes, A.L. & Totland, r. (2009). How does climate warming affect plant-pollinator interactions ? *Ecology letters*, 12, 184–195.
- Hirsch, M., Pfaff, S. & Wolters, V. (2003). The influence of matrix type on flower visitors of *Centaurea jacea* L. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98, 331–337.
- Honnay, O. & Bossuyt, B. (2005). Prolonged clonal growth : escape route or route to extinction ? *Oikos*, 108, 427–432.
- Honnay, O. & Jacquemyn, H. (2008). A meta-analysis of the relation between mating system, growth form and genotypic diversity in clonal plant species. *Evolutionary Ecology*, 22, 299–312.
- Honnay, O., Jacquemyn, H., Bossuyt, B. & Hermy, M. (2005). Forest fragmentation effects on patch occupancy and population viability of herbaceous plant species. *New Phytologist*, 166, 723–736.
- Honnay, O., Jacquemyn, H., Roldá-Ruiz, I. & Hermy, M. (2006). Consequences of prolonged clonal growth on local and regional genetic structure and fruiting success of the forest perennial *Maianthemum bifolium*. *Oikos*, 112, 21–30.
- Hooftman, D.A.P. & Diemer, M. (2002). Effects of small habitat size and isolation on the population structure of common wetland species. *Plant Biology*, 4, 720–728.
- Hooftman, D.A.P., van Kleunen, M. & Diemer, M. (2003). Effects of habitat fragmentation on the fitness of two common wetland species, *Carex davalliana* and *Succisa pratensis*. *Oecologia*, 134, 350–359.
- Hopwood, J.L. (2008). The contribution of roadside grassland restorations to native bee conservation. *Biological Conservation*, 141, 2632–2640.
- Huber, H., Lukács, S. & Watson, M.A. (1999). Spatial structure of stoloniferous herbs : an interplay between structural blue-print, ontogeny and phenotypic plasticity. *Plant Ecology*, 141, 107–115.
- Huber, R.E. & Mathison, R.D. (1976). Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrose of honey bees (*Apis mellifera*). *Canadian journal of biochemistry*, 54, 153–164.

- Huhta, A.P., Lennartsson, T., Tuomi, J., Rautio, P. & Laine, K. (2000). Tolerance of *gentianella campestris* in relation to damage intensity : an interplay between apical dominance and herbivory. *Evolutionary Ecology*, 14, 373–392.
- Hulme, P. & Bremner, E. (2006). Assessing the impact of *Impatiens glandulifera* on riparian habitats : partitioning diversity components following species removal. *Journal of Applied Ecology*, 43, 43–50.
- Hultén, E. & Fries, M. (1986). *Atlas of North European Vascular Plants : North of the Tropic of Cancer*. Koeltz.
- Human, H., Nicolson, S., Strauss, K., Pirk, C. & Dietemann, V. (2007). Influence of pollen quality on ovarian development in honeybee workers (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Insect Physiology*, 53, 649–655.
- Hurlbert, S.H. (1984). Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*, 54, 187–211.
- Husband, B. & Schemske, D. (1995). Magnitude and timing of inbreeding depression in a diploid population of *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *Heredity*, 75, 206–215.
- Husband, B.C. & Schemske, D.W. (1996). Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, 50, 54–70.
- Inouye, D.W. (1980). The terminology of floral larceny. *Ecology*, 61, 1251–1253.
- Inouye, D.W., Gill, D.E., Dudash, M.R. & Fenster, C.B. (1994). A model and lexicon for pollen fate. *American journal of botany*, 81, 1517–1530.
- Irwin, R.E. & Maloof, J.E. (2002). Variation in nectar robbing over time, space, and species. *Oecologia*, 133, 525–533.
- Ishii, H.S. (2005). Analysis of bumblebee visitation sequences within single bouts : implication of the overstrike effect on short-term memory. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57, 599–610.
- Ismail, S.A., Ghazoul, J., Ravikanth, G., Uma Shaanker, R., Kushalappa, C.G. & Kettle, C.J. (2012). Does long-distance pollen dispersal preclude inbreeding in tropical trees ? Fragmentation genetics of *Dysoxylum malabaricum* in an agro-forest landscape. *Molecular Ecology*, 21, 5484–5496.
- IUCN (2013). The IUCN red list of threatened species.
- Ivey, C.T., Martinez, P. & Wyatt, R. (2003). Variation in pollinator effectiveness in swamp milkweed, *Asclepias incarnata* (Apocynaceae). *American Journal of Botany*, 90, 214–225.

BIBLIOGRAPHIE

- Jacob, J.P. & Remacle, A. (2005). La gestion des carrières en faveur de l'entomofaune : le cas de la carrière du Haut des Loges à Vance (Province de Luxembourg, Belgique). *Notes fauniques de Gembloux*, 57, 59–66.
- Jacquemart, A.L. & Angenot, A. (2004). Un écosystème original, la tourbière. Le cas des tourbières acides en Belgique. *Probio revue*, 4, 257–276.
- Jacquemart, A.L., Angenot, A., De Sloover, J. & Iserentant, R. (2008). *La réserve naturelle domaniale du plateau des Tailles et ses milieux tourbeux - approche géographique, historique et biologique*. 62. Glain et Salm Haute Ardenne.
- Janson, E.M., Grebenok, R.J., Behmer, S.T. & Abbot, P. (2009). Same host-plant, different sterols : variation in sterol metabolism in an insect herbivore community. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 1309–1319.
- Jensen, K. (2004). Dormancy patterns, germination ecology, and seed-bank types of twenty temperate fen grassland species. *Wetlands*, 24, 152–166.
- Jha, S. & Kremen, C. (2012). Resource diversity and landscape-level homogeneity drive native bee foraging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201208682.
- Jha, S. & Kremen, C. (2013). Urban land use limits regional bumble bee gene flow. *Molecular Ecology*, pp. 2483–2495.
- Johnson, S., Hollens, H. & Kuhlmann, M. (2012). Competition versus facilitation : conspecific effects on pollinator visitation and seed set in the iris *Lapeirousia oreo-gena*. *Oikos*, 121, 545–550.
- Joosten, H. & Clarke, D. (2002). *Wise Use of Mires and Peatlands : Background and Principles Including a Framework for Decision-making*. Internationale Mire Conservation Group and International Peat Society.
- Jordan, W. (1997). Ecological restoration and the conservation of biodiversity. In : *Biodiversity II : understanding and protecting our biological resources*. Marjorie L. Reaka-Kudla, Don E. Wilson, and Edward O. Wilson, Washington, D.C., pp. 371–387. Joseph Henry press edn.
- Kőrösi, d., Örvösy, N., Batáry, P., Harnos, A. & Peregovits, L. (2012). Different habitat selection by two sympatric *Maculinea* butterflies at small spatial scale. *Insect Conservation and Diversity*, 5, 118–126.
- Kalinowski, S.T. & Taper, M.L. (2006). Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 7, 991–995.
- Kalisz, S., Vogler, D.W. & Hanley, K.M. (2004). Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature*, 430, 884–887.

- Kaljung, K., Leht, M. & Jaaska, V. (2013). Highly variable clonal diversity and spatial structure in populations of sickle medic. *Biochemical Systematics and Ecology*, 47, 93–100.
- Karron, J.D., Holmquist, K.G., Flanagan, R.J. & Mitchell, R.J. (2009). Pollinator visitation patterns strongly influence among-flower variation in selfing rate. *Annals of Botany*, 103, 1379–1383.
- Karron, J.D., Mitchell, R.J., Holmquist, K.G., Bell, J.M. & Funk, B. (2003). The influence of floral display size on selfing rates in *Mimulus ringens*. *Heredity*, 92, 242–248.
- Kearns, C.A. & Inouye, D.W. (1993). *Techniques for Pollination Biologists*. University Press of Colorado, Niwot, CO.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W. & Waser, N.M. (1998). Endangered mutualisms : the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 83–112.
- Kells, A.R. & Goulson, D. (2003). Preferred nesting sites of bumblebee queens (Hymenoptera : Apidae) in agroecosystems in the UK. *Biological Conservation*, 109, 165–174.
- Kelt, D.A. (2001). Differential effects of habitat fragmentation on birds and mammals in valdivian temperate rainforests. *Revista chilena de historia natural*, 74, 769–777.
- Kennedy, C.M., Lonsdorf, E., Neel, M.C., Williams, N.M., Ricketts, T.H., Winfree, R., Bommarco, R., Brittain, C., Burley, A.L., Cariveau, D., Carvalheiro, L.G., Chacoff, N.P., Cunningham, S.A., Danforth, B.N., Dudenhöffer, J.H., Elle, E., Gaines, H.R., Garibaldi, L.A., Gratton, C., Holzschuh, A., Isaacs, R., Javorek, S.K., Jha, S., Klein, A.M., Krewenka, K., Mandelik, Y., Mayfield, M.M., Morandin, L., Neame, L.A., Otieno, M., Park, M., Potts, S.G., Rundlöf, M., Saez, A., Steffan-Dewenter, I., Taki, H., Viana, B.F., Westphal, C., Wilson, J.K., Greenleaf, S.S. & Kremen, C. (2013). A global quantitative synthesis of local and landscape effects on wild bee pollinators in agroecosystems. *Ecology Letters*, 16, 584–599.
- Kestemont, B. (2010). A red list of belgian threatened species.
- Kindlmann, P. & Burel, F. (2008). Connectivity measures : a review. *Landscape Ecology*, 23, 879–890.
- Kindt, R. & Coe, R. (2005). *Tree Diversity Analysis : A Manual and Software for Common Statistical Methods for Ecological and Biodiversity Studies*. World Agroforestry Centre.

BIBLIOGRAPHIE

- Kindvall, O. (1995). The impact of extreme weather on habitat preference and survival in a metapopulation of the bush cricket *Metrioptera bicolor* in Sweden. *Biological Conservation*, 73, 51–58.
- Kitaoka, T.K. & Nieh, J.C. (2009). Bumble bee pollen foraging regulation : role of pollen quality, storage levels, and odor. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63, 625–625.
- Kiviniemi, K. (2001). Evolution of recruitment features in plants : a comparative study of species in the Rosaceae. *Oikos*, 94, 250–262.
- Klank, C., Pluess, A.R. & Ghazoul, J. (2010). Effects of population size on plant reproduction and pollinator abundance in a specialized pollination system. *Journal of Ecology*, 98, 1389–1397.
- Kleijn, D. & Raemakers, I. (2008). A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology*, 89, 1811–1823.
- Kleijn, D. & Steinger, T. (2002). Contrasting effects of grazing and hay cutting on the spatial and genetic population structure of *Veratrum album*, an unpalatable, long-lived, clonal plant species. *Journal of Ecology*, 90, 360–370.
- Klimeš, L., Klimešová, J., Hendriks, R. & van Groenendael, J. (1997). Clonal plant architecture : a comparative analysis of form and function. In : *The ecology and evolution of clonal plants*. H. de Kroon et J. van Groenendael, Leiden, The Netherlands, pp. 1–29. Backhuys publishers edn.
- Knight, M.E., Martin, A.P., Bishop, S., Osborne, J.L., Hale, R.J., Sanderson, R.A. & Goulson, D. (2005a). An interspecific comparison of foraging range and nest density of four bumblebee (*Bombus*) species. *Molecular Ecology*, 14, 1811–1820.
- Knight, T.M. (2003). Floral density, pollen limitation, and reproductive success in *Trillium grandiflorum*. *Oecologia*, 137, 557–563.
- Knight, T.M., Steets, J.A., Vamosi, J.C., Mazer, S.J., Burd, M., Campbell, D.R., Dush, M.R., Johnston, M.O., Mitchell, R.J. & Ashman, T.L. (2005b). Pollen limitation of plant reproduction : pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, 467–497.
- Kolos, A. & Banaszuk, P. (2013). Mowing as a tool for wet meadows restoration : effect of long-term management on species richness and composition of sedge-dominated wetland. *Ecological Engineering*, 55, 23–28.
- Koltunow, A.M., Bicknell, R.A. & Chaudhury, A.M. (1995). Apomixis : Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology*, 108, 1345–1352.

- Krämer, B., Poniatowski, D. & Fartmann, T. (2012). Effects of landscape and habitat quality on butterfly communities in pre-alpine calcareous grasslands. *Biological Conservation*, 152, 253–261.
- Kremen, C., Williams, N.M., Aizen, M.A., Gemmill-Herren, B., LeBuhn, G., Minckley, R., Packer, L., Potts, S.G., Roulston, T., Steffan-Dewenter, I., Vázquez, D.P., Winfree, R., Adams, L., Crone, E.E., Greenleaf, S.S., Keitt, T.H., Klein, A.M., Regetz, J. & Ricketts, T.H. (2007). Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms : a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letters*, 10, 299–314.
- Kreyer, D., Oed, A., Walther-Hellwig, K. & Frankl, R. (2004). Are forests potential landscape barriers for foraging bumblebees ? Landscape scale experiments with *Bombus terrestris* agg. and *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apidae). *Biological Conservation*, 116, 111–118.
- Kroon, G.H., Kroon, G.H.P. & Velthuis, H.H.W. (1974). Osmotic shock as a prerequisite to pollen digestion in the alimentary tract of the worker honeybee. *J. Apic. Res.*, 13, 177–181.
- Kroons, H.d. & Hutchings, M.J. (1995). Morphological plasticity in clonal plants : the foraging concept reconsidered. *Journal of Ecology*, 83, 143–152.
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G. & Given, K. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE*, 7, e29268.
- Kubik, M., Nowacki, J., Pidek, A., Warakomska, Z., Michalczyk, L. & Goszczyński, W. (1999). Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie*, 30, 521–532.
- Kwak, M.M. & Jennersten, O. (1991). Bumblebee visitation and seedset in *Melampyrum pratense* and *Viscaria vulgaris* : heterospecific pollen and pollen limitation. *Oecologia*, 86, 99–104.
- Kwak, M.M., Velterop, O. & Andel, J.v. (1998). Pollen and gene flow in fragmented habitats. *Applied Vegetation Science*, 1, 37–54.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H. & Andersson, L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic acids research*, 21, 1111–1115.
- Lambinon, J., Delvosalle, L. & Duvigneaud, J. (2004). *Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines - (Ptéridophytes et Spermatophytes)*. 5th edn. Jardin botanique de Belgique.

BIBLIOGRAPHIE

- Lambinon, J. & Verloove, F. (2012). *Nouvelle Flore de Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines. Sixième édition*. Jardin botanique national de Belgique, Meise.
- Lamens, J., Geukens, F. & Viaene, W. (1986). Geological setting and genesis of coticules (spessartine metapelites) in the Lower Ordovician of the Stavelot Massif, Belgium. *Journal of the Geological Society*, 143, 253–258.
- Lamers, L.P.M., Smolders, A.J.P. & Roelofs, J.G.M. (2002). The restoration of fens in the Netherlands. *Hydrobiologia*, 478, 107–130.
- Larson, B.M.H. & Barrett, S.C.H. (2000). A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69, 503–520.
- Lawalrée, A. (1961). *Rosaceae-Comarum, Fragaria, Filipendula, Agrimonia, Sanguisorba, Alchemilla, Aphanes, Rosa Vol II*,. Jardin botanique national de Belgique. edn. Jardin botanique national de Belgique., Bruxelles.
- Lebrun, J., Noirfalise, A., Heinemann, P. & Vanden berghen, C. (1949). Les associations végétales de Belgique. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique*, 82, 105–207.
- Leimu, R., Mutikainen, P., Koricheva, J. & Fischer, M. (2006). How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*, 94, 942–952.
- Lenssen, J.P.M., Van Kleunen, M., Fischer, M. & De Kroon, H. (2004). Local adaptation of the clonal plant *Ranunculus reptans* to flooding along a small-scale gradient. *Journal of Ecology*, 92, 696–706.
- Leonhardt, S.D. & Blüthgen, N. (2012). The same, but different : pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies. *Apidologie*, 43, 449–464.
- Liao, K., Gituru, R.W., Guo, Y.H. & Wang, Q.F. (2011). The presence of co-flowering species facilitates reproductive success of *Pedicularis monbeigiana* (Orobanchaceae) through variation in bumble-bee foraging behaviour. *Annals of Botany*, 108, 877–884.
- Lieffers, V.J. & Rothwell, R.L. (1987). Effects of drainage on substrate temperature and phenology of some trees and shrubs in an Alberta peatland. *Canadian Journal of Forest Research*, 17, 97–104.
- Lienert, J. (2004). Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations - a review. *Journal for Nature Conservation*, 12, 53–72.
- Lloyd, D.G. (1992). Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, 153, 370–380.

- Lloyd, D.G. & Schoen, D.J. (1992). Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences*, 153, 358–369.
- Lognay, G., Severin, M., Boenke, A. & Wagstaffe, P.J. (1992). Edible fats and oils reference materials for sterols analysis with particular attention to cholesterol. Part 1. Investigation of some analytical aspects by experienced laboratories. *Analyst*, 117, 1093–1097.
- Louâpre, P., Bittebière, A.K., Clément, B., Pierre, J.S. & Mony, C. (2012). How past and present influence the foraging of clonal plants ? *PLoS ONE*, 7, e38288.
- Lovett-Doust, L. (1981). Population dynamics and local specialization in a clonal perennial (*Ranunculus repens*) : I. The dynamics of ramets in contrasting habitats. *Journal of Ecology*, 69, 743–755.
- Lyanguzova, I.V. (2011). Effect of industrial air pollution on wild plant seed germination and seedling growth. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58, 991–998.
- Ma, Z.Q., Röder, M. & Sorrells, M.E. (1996). Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada*, 39, 123–130.
- MacDonald, D., Crabtree, J., Wiesinger, G., Dax, T., Stamou, N., Fleury, P., Gutierrez Lazpita, J. & Gibon, A. (2000). Agricultural abandonment in mountain areas of Europe : environmental consequences and policy response. *Journal of Environmental Management*, 59, 47–69.
- Macek, P. & Lepš, J. (2007). Environmental correlates of growth traits of the stoloniferous plant *Potentilla palustris*. *Evolutionary Ecology*, 22, 419–435.
- Mahy, G. & Jacquemart, A.L. (1999). Early inbreeding depression and pollen competition in *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Annals of Botany*, 83, 697–704.
- Maiorano, L., Falcucci, A., Garton, E.O. & Boitani, L. (2007). Contribución de la Red Natura 2000 a la conservación de la biodiversidad en Italia. *Conservation Biology*, 21, 1433–1444.
- Makino, T.T., Ohashi, K. & Sakai, S. (2007). How do floral display size and the density of surrounding flowers influence the likelihood of bumble bee revisitation to a plant ? *Functional Ecology*, 21, 87–95.
- Malbrouck, J. & De Sloover (1989). *Le plateau des Tailles en Haute Ardenne*. Congrès européen des professeurs de biologie et de géologie, Bruxelles.
- Maloof, J.E. & Inouye, D.W. (2000). Are nectar robbers cheaters or mutualists ? *Ecology*, 81, 2651–2661.

BIBLIOGRAPHIE

- Manneville, O., Vergne, V. & Villepoux, O. (2006). *Le monde des tourbières et des marais : France, Suisse, Belgique, Luxembourg*. Delachaux et Niestlé, Paris.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B. & Pemberton, J.M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655.
- Martin, J.F., Pech, N., Megléc, E., Ferreira, S., Costedoat, C., Dubut, V., Malausa, T. & Gilles, A. (2010). Representativeness of microsatellite distributions in genomes, as revealed by 454 GS-FLX titanium pyrosequencing. *BMC genomics*, 11, 560.
- Mathieu, C. & Lozet, J. (2011). *Dictionnaire encyclopédique de science du sol*. Lavoisier.
- Mayer, C., Michez, D., Chyzy, A., Brédet, E. & Jacquemart, A.L. (2012a). The abundance and pollen foraging behaviour of bumble bees in relation to population size of whortleberry (*Vaccinium uliginosum*). *PLoS ONE*, 7.
- Mayer, C., Van Rossum, F. & Jacquemart, A.L. (2012b). Evaluating pollen flow indicators for an insect-pollinated plant species. *Basic and Applied Ecology*, 13, 690–697.
- Meekers, T. & Honnay, O. (2011). Effects of habitat fragmentation on the reproductive success of the nectar-producing orchid *Gymnadenia conopsea* and the nectarless *Orchis mascula*. *Plant Ecology*, 212, 1791–1801.
- Meeus, I., Brown, M., De Graaf, D. & Smagghe, G. (2011). Effects of invasive parasites on bumble bee declines. *Conservation Biology*, 25, 662–671.
- Memmott, J., Waser, N. & Price, M. (2004). Tolerance of pollination networks to species extinctions. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 271, 2605–2611.
- Menz, M.H., Phillips, R.D., Winfree, R., Kremen, C., Aizen, M.A., Johnson, S.D. & Dixon, K.W. (2011). Reconnecting plants and pollinators : challenges in the restoration of pollination mutualisms. *Trends in Plant Science*, 16, 4–12.
- Metsoja, J.A., Neuenkamp, L., Pihu, S., Vellak, K., Kalwij, J.M. & Zobel, M. (2012). Restoration of flooded meadows in Estonia - vegetation changes and management indicators. *Applied Vegetation Science*, 15, 231–244.
- Mhemmed, G., Kamel, H. & Chedly, A. (2008). Does habitat fragmentation reduce genetic diversity and subpopulation connectivity ? *Ecography*, 31, 751–756.
- Michener, C.D. (2007). *The bees of the world*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

- Middleton, B.A., Grootjans, A., Jensen, K., Venterink, H.O. & Margóczy, K. (2006a). Fen management and research perspectives : An overview. In : *Wetlands : Functioning, Biodiversity Conservation, and Restoration* (eds. Bobbink, D.R., Beltman, D.B., Verhoeven, P.D.J.T.A. & Whigham, P.D.D.F.). Springer Berlin Heidelberg, no. 191 in Ecological Studies, pp. 247–268.
- Middleton, B.A., Holsten, B. & van Diggelen, R. (2006b). Biodiversity management of fens and fen meadows by grazing, cutting and burning. *Applied Vegetation Science*, 9, 307–316.
- Müller, A., Diener, S., Schnyder, S., Stutz, K., Sedivy, C. & Dorn, S. (2006). Quantitative pollen requirements of solitary bees : implications for bee conservation and the evolution of bee-flower relationships. *Biological Conservation*, 130, 604–615.
- Moilanen, A. & Nieminen, M. (2002). Simple connectivity measures in spatial ecology. *Ecology*, 83, 1131–1145.
- Molina-Montenegro, M.A., Badano, E.I. & Cavieres, L.A. (2008). Positive interactions among plant species for pollinator service : assessing the "magnet species" concept with invasive species. *Oikos*, 117, 1833–1839.
- Montanarella, L., Jones, R. & Hiederer, R. (2006). The distribution of peatland in Europe. *Mires and Peat*, 1, 1–10.
- Morgan, M.T., Schoen, D.J. & Bataillon, T.M. (1997). The evolution of self-fertilization in perennials. *The American naturalist*, 150, 618–638.
- Moroń, D., Szentgyörgyi, H., Wantuch, M., Celary, W., Westphal, C., Settele, J. & Woyciechowski, M. (2008). Diversity of wild bees in wet meadows : implications for conservation. *Wetlands*, 28, 975–983.
- Mullenders, W. (1954). La position phytogéographique des hauts plateaux belges. *Vegetatio*, 5-6, 112–119.
- Muller, S.D., Miramont, C., Bruneton, H., Carré, M., Sottocornola, M., Court-Picon, M., de Beaulieu, J.L., Nakagawa, T. & Schevin, P. (2012). A palaeoecological perspective for the conservation and restoration of wetland plant communities in the central French Alps, with particular emphasis on alder carr vegetation. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 171, 124–139.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D. & Pettis, J.S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries : implications for honey bee health. *PLoS ONE*, 5, e9754.
- Munidasa, D.T. & Toquenaga, Y. (2010). Do pollen diets vary among adjacent bumble bee colonies ? *Ecological Research*, 25, 639–646.

BIBLIOGRAPHIE

- Münzbergová, Z., Cousins, S., Herben, T., Plačková, I., Mildén, M. & Ehrlén, J. (2013). Historical habitat connectivity affects current genetic structure in a grassland species. *Plant Biology*, 15, 195–202.
- Murren, C.J. (2002). Effects of habitat fragmentation on pollination : pollinators, pollinia viability and reproductive success. *Journal of Ecology*, 90, 100–107.
- Nagamitsu, T., Kenta, T., Inari, N., Horita, H., Goka, K. & Hiura, T. (2007). Foraging interactions between native and exotic bumblebees : enclosure experiments using native flowering plants. *Journal of Insect Conservation*, 11, 123–130.
- Nicolson, S.W. (2011). Bee food : The chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46, 197–204.
- Nicolson, S.W., Nepi, M. & Pacini, E. (2007). *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht.
- Öckinger, E., Lindborg, R., Sjödin, N.E. & Bommarco, R. (2012). Landscape matrix modifies richness of plants and insects in grassland fragments. *Ecography*, 35, 259–267.
- Öckinger, E. & Smith, H.G. (2007). Semi-natural grasslands as population sources for pollinating insects in agricultural landscapes. *Journal of Applied Ecology*, 44, 50–59.
- Ohsako, T. (2010). Clonal and spatial genetic structure within populations of a coastal plant, *Carex kobomugi* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, 97, 458–470.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. & Wagner, H. (2013). *Vegan : Community ecology package*.
- Olesen, I. & Warncke, E. (1992). Breeding system and seasonal variation in seed set in a population of *Potentilla palustris*. *Nordic Journal of Botany*, 12, 373–380.
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R. & Vieira, M.L.C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Ollerton, J., Winfree, R. & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals ? *Oikos*, 120, 321–326.
- Onclincx, F., Tanghe, M., Galoux, A. & Weissen, F. (1987). La carte des territoires écologiques de la Wallonie. *Revue Belge de Géographie*, 1-2, 51–59.
- Ortego, J., Bonal, R. & Muñoz, A. (2010). Genetic consequences of habitat fragmentation in long-lived tree species : the case of the Mediterranean holm oak (*Quercus ilex* L.). *Journal of Heredity*.

- Osborne, J.L. (2012). Ecology : bumblebees and pesticides. *Nature*, 491, 43–45.
- Osborne, J.L., Martin, A.P., Carreck, N.L., Swain, J.L., Knight, M.E., Goulson, D., Hale, R.J. & Sanderson, R.A. (2008). Bumblebee flight distances in relation to the forage landscape. *The Journal of animal ecology*, 77, 406–415.
- Ostermann, O.P. (1998). The need for management of nature conservation sites designated under Natura 2000. *Journal of Applied Ecology*, 35, 968–973.
- Pan, J.J. & Price, J.S. (2001). Fitness and evolution in clonal plants : the impact of clonal growth. *Evolutionary Ecology*, 15, 583–600.
- Parks, J.C. & Werth, C.R. (1993). A study of spatial features of clones in a population of bracken fern, *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany*, 80, 537–544.
- Paul, S. (2003). Inbreeding and small population size reduce seed set in a threatened and fragmented plant species, *Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii* (Fabaceae). *Biological Conservation*, 110, 221–229.
- Payette, S. & Rochefort, L. (2001). *Ecologie des tourbières du Québec-Labrador*. Presses Université Laval.
- Pelletier, L. & McNeil, J.N. (2003). The effect of food supplementation on reproductive success in bumblebee field colonies. *Oikos*, 103, 688–694.
- Percival, M.S. (1961). Types of nectar in Angiosperms. *New Phytologist*, 60, 235–281.
- Petanidou, T. & Ellis, W.N. (1993). Pollinating fauna of a phryganic ecosystem : composition and diversity. *Biodiversity Letters*, 1, 9–22.
- Pickett, S.T.A. & Cadenasso, M.L. (1995). Landscape ecology : spatial heterogeneity in ecological systems. *Science*, 269, 331–334.
- Pico, F.X. & Van Groenendael, J. (2007). Large-scale plant conservation in European semi-natural grasslands : a population genetic perspective. *Diversity and Distributions*, 13, 920–926.
- Piessens, K., Honnay, O. & Hermy, M. (2005). The role of fragment area and isolation in the conservation of heathland species. *Biological Conservation*, 122, 61–69.
- Piqueras, J. (1999). Herbivory and ramet performance in the clonal herb *Trientalis europaea* L. *Journal of Ecology*, 87, 450–460.
- van de Pol, M. & Wright, J. (2009). A simple method for distinguishing within- versus between-subject effects using mixed models. *Animal Behaviour*, 77, 753–758.

BIBLIOGRAPHIE

- Poncelet, L. (1947). *Esquisse climatographique de la Belgique*. Institut royal météorologique de Belgique, mémoires edn. vol. 27 of *Institut Royal Météorologique de Belgique, Mémoires*. Institut Royal Météorologique de Belgique, Mémoires, Bruxelles.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. & Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines : trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 345–353.
- Pouvreau, A. (2004). *Insectes pollinisateurs*. Delachaux & Niestlé.
- Price, M.V. & Waser, N.M. (1979). Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsoni*. *Nature*, 277, 294–297.
- Primack, R.B. (2010). *Essentials of Conservation Biology, Fifth Edition*. Fifth edition edn. Sinauer Associates, Inc.
- Proctor, M., Yeo, P. & Lack, A. (1996). *The Natural History of Pollination*. Timber Press, Incorporated.
- Pyke, G.H. (1980). Optimal foraging in bumblebees : calculation of net rate of energy intake and optimal patch choice. *Theoretical Population Biology*, 17, 232–246.
- Pyke, G.H., Inouye, D.W. & Thomson, J.D. (2011). Activity and abundance of bumble bees near Crested Butte, Colorado : diel, seasonal, and elevation effects. *Ecological Entomology*, 36, 511–521.
- R Development Core Team (2012). R : a language and environment for statistical computing. r foundation for statistical computing, vienna.
- Raguso, R.A. (2004). Flowers as sensory billboards : progress towards an integrated understanding of floral advertisement. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 434–440.
- Rasmont, P. & Iserbyt, S. (2012). The bumblebees scarcity syndrome : are heat waves leading to local extinctions of bumblebees (Hymenoptera : Apidae : *Bombus*). *Annales de la Societe Entomologique de France*, 48, 275–280.
- Rasmont, P. & Mersch, P. (1988). Première estimation de la dérive faunique chez les bourdons de la Belgique (Hymenoptera : Apidae). *Annales de la Société royale zoologique de Belgique*, 118, 141–147.
- Rasmont, P., Pauly, A., Terzo, M., Patiny, S., Michez, D., Iserbyt, S., Barbier, Y. & Haubruge, E. (2005a). The survey of wild bees (Hymenoptera, Apoidea) in Belgium and France. *The survey of wild bees in Belgium and France*.

- Rasmont, P., Regali, A., Ings, T.C., Lognay, G., Baudart, E., Marlier, M., Delcarte, E., Viville, P., Marot, C., Falmagne, P., Verhaeghe, J.C. & Chittka, L. (2005b). Analysis of pollen and nectar of *Arbutus unedo* as a food source for *Bombus terrestris* (Hymenoptera : Apidae). *Journal of economic entomology*, 98, 656–663.
- Raspé, O., Guillaume & Jacquemart, A. (2004). Inbreeding depression and biased paternity after mixed-pollination in *Vaccinium myrtillus* L. (Ericaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 165, 765–771.
- Rasran, L., Vogt, K. & Jensen, K. (2007). Effects of litter removal and mowing on germination and establishment of two fen-grassland species along a productivity gradient. *Folia Geobotanica*, 42, 271–288.
- Rautiainen, P., Koivula, K. & Hyvärinen, M. (2004). The effect of within-genet and between-genet competition on sexual reproduction and vegetative spread in *Potentilla anserina* ssp. *egedii*. *Journal of Ecology*, 92, 505–511.
- Reitalu, T., Johansson, L.J., Sykes, M.T., Hall, K. & Prentice, H.C. (2010). History matters : village distances, grazing and grassland species diversity. *Journal of Applied Ecology*, 47, 1216–1224.
- Ritland, K. (2002). Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity*, 88, 221–228.
- Roberts, D.W. (2012). labdsv : Ordination and multivariate analysis for ecology.
- Robertson, A.W., Mountjoy, C., Faulkner, B.E., Roberts, M.V. & Macnair, M.R. (1999). Bumble bee selection of *Mimulus guttatus* flowers : the effects of pollen quality and reward depletion. *Ecology*, 80, 2594–2606.
- Roff, D.A. (1997). *Evolutionary quantitative genetics*. Chapman & Hall, New York.
- Rollin, O., Bretagnolle, V., Decourtye, A., Aptel, J., Michel, N., Vaissière, B.E. & Henry, M. (2013). Differences of floral resource use between honey bees and wild bees in an intensive farming system. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 179, 78–86.
- Rosenthal, G. & Lederbogen, D. (2008). Response of the clonal plant *Apium repens* (Jacq.) Lag. to extensive grazing. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 203, 141–151.
- Rosenthal, G., Schrautzer, J. & Eichberg, C. (2012). Low-intensity grazing with domestic herbivores : a tool for maintaining and restoring plant diversity in temperate Europe. *Tuexenia*, 32, 167–205.
- Rossum, F.V. & Triest, L. (2006). Fine-scale genetic structure of the common *Primula elatior* (Primulaceae) at an early stage of population fragmentation. *American Journal of Botany*, 93, 1281–1288.

BIBLIOGRAPHIE

- Roulston, T.H. & Cane, J.H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222, 187–209.
- Roulston, T.H., Cane, J.H. & Buchmann, S.L. (2000). What governs protein content of pollen : pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny ? *Ecological Monographs*, 70, 617–643.
- Roulston, T.H. & Goodell, K. (2011). The role of resources and risks in regulating wild bee populations. *Annual Review of Entomology*, 56, 293–312.
- Routley, M.B. & Husband, B.C. (2003). The effect of protandry on siring success in *Chamerion angustifolium* (Onagraceae) with different inflorescence sizes. *Evolution ; international journal of organic evolution*, 57, 240–248.
- Rozema, J., Weijers, S., Broekman, R., Blokker, P., Buizer, B., Werleman, C., El Yagine, H., Hoogedoorn, H., Fuertes, M.M. & Cooper, E. (2009). Annual growth of *Cassiope tetragona* as a proxy for Arctic climate : developing correlative and experimental transfer functions to reconstruct past summer temperature on a millennial time scale. *Global Change Biology*, 15, 1703–1715.
- Rozen, S. & Skaletsky, H.J. (2000). PRIMER3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In : *Bioinformatics Methods and Protocols : Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 365–386. Krawetz s & misener s edn.
- Rudnick, D., Ryan, S., Beier, P., Cushman, S., Dieffenbach, F., Epps, C., Gerber, L., Hartter, J., Jenness, J., Kintsch, J., Merenlender, A., Perkl, R., Preziosi, D. & Trombulak, S. (2012). The role of landscape connectivity in planning and implementing conservation and restoration priorities. *Issues in ecology*, 16, 20–20.
- Russell, K., Ikerd, H. & Droege, S. (2005). The potential conservation value of unmowed powerline strips for native bees. *Biological Conservation*, 124, 133–148.
- Saintenoy-Simon, J., Barbier, Y., Delescaille, L.M., Dufrêne, M., Gathoye, J.L. & Verté, P. (2006). Première liste des espèces rares, menacées et protégées de la région wallonne (ptéridophytes et spermatophytes). version 1 (7/3/2006).
- Sammul, M., Kull, K., Niitla, T. & Möls, T. (2004). A comparison of plant communities on the basis of their clonal growth patterns. *Evolutionary Ecology*, 18, 443–467.
- Sargent, R.D., Kembel, S.W., Emery, N.C., Forrestel, E.J. & Ackerly, D.D. (2011). Effect of local community phylogenetic structure on pollen limitation in an obligately insect-pollinated plant. *American Journal of Botany*, 98, 283–289.
- Sarneel, J.M. & Soons, M.B. (2012). Post-dispersal probability of germination and establishment on the shorelines of slow-flowing or stagnant water bodies. *Journal of Vegetation Science*, 23, 517–525.

- Sarneel, J.M., Soons, M.B., Geurts, J.J.M., Beltman, B. & Verhoeven, J.T.A. (2011). Multiple effects of land-use changes impede the colonization of open water in fen ponds. *Journal of Vegetation Science*, 22, 551–563.
- Saunders, D.A., Hobbs, R.J. & Margules, C.R. (1991). Biological consequences of ecosystem fragmentation : A review. *Conservation Biology*, 5, 18–32.
- Savage, J., Wheeler, T.A., Moores, A.M.A. & Taillefer, A.G. (2011). Effects of habitat size, vegetation cover, and surrounding land use on Diptera diversity in temperate nearctic bogs. *Wetlands*, 31, 125–134.
- Schaefer, C.W. & Chopra, N.P. (1982). Cladistic analysis of the Rhopalidae, with a list of food plants. *Annals of the Entomological Society of America*, 75, 224–233.
- Schleuning, M., Niggemann, M., Becker, U. & Matthies, D. (2009). Negative effects of habitat degradation and fragmentation on the declining grassland plant *Trifolium montanum*. *Basic and Applied Ecology*, 10, 61–69.
- Schlindwein, C., Wittmann, D., Martins, C.F., Hamm, A., Siqueira, J.A., Schiffler, D. & Machado, I.C. (2005). Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae) : how much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators ? *Plant Systematics and Evolution*, 250, 147–156.
- Schmucki, R. & de Blois, S. (2009). Pollination and reproduction of a self-incompatible forest herb in hedgerow corridors and forest patches. *Oecologia*, 160, 721–733.
- Schüepp, C., Herrmann, J.D., Herzog, F. & Schmidt-Entling, M.H. (2011). Differential effects of habitat isolation and landscape composition on wasps, bees, and their enemies. *Oecologia*, 165, 713–721.
- Schumann, M. & Mauersberger, R. (2009). Conservation focused topsoil removal in calcareous fens - field experiences from Northern Brandenburg. *Telma*, pp. 157–174.
- Schwarz, D., Robertson, H.M., Feder, J.L., Varala, K., Hudson, M.E., Ragland, G.J., Hahn, D.A. & Berlocher, S.H. (2009). Sympatric ecological speciation meets pyrosequencing : sampling the transcriptome of the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *BMC genomics*, 10, 633.
- Sedivy, C., Müller, A. & Dorn, S. (2011). Closely related pollen generalist bees differ in their ability to develop on the same pollen diet : evidence for physiological adaptations to digest pollen. *Functional Ecology*, 25, 718–725.
- Sepp, K., Mikk, M., Mänd, M. & Truu, J. (2004). Bumblebee communities as an indicator for landscape monitoring in the agri-environmental programme. *Landscape and Urban Planning*, 67, 173–183.

BIBLIOGRAPHIE

- Shao, J., Zhang, X., Zhang, Z. & Zhu, G. (2008). Effects of population size on reproductive success of the endangered and endemic species *Primula merrilliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 1151–1160.
- Sieffermann, R.G. (1988). Le système des grandes tourbières équatoriales. *Annales de Géographie*, 97, 642–666.
- Silvertown, J. (2008). The evolutionary maintenance of sexual reproduction : evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *International Journal of Plant Sciences*, 169, 157–168.
- Skoglund, S.J. (1990). Seed dispersing agents in two regularly flooded river sites. *Canadian Journal of Botany*, 68, 754–760.
- Slamova, I., Klecka, J. & Konvicka, M. (2013). Woodland and grassland mosaic from a butterfly perspective : habitat use by *Erebia aethiops* (Lepidoptera : Satyridae). *Insect Conservation and Diversity*, 6, 243–254.
- Smeets, P. & Duchateau, M.J. (2003). Longevity of *Bombus terrestris* workers (Hymenoptera : Apidae) in relation to pollen availability, in the absence of foraging. *Apidologie*, 34, 333–337.
- Söderström, B., Svensson, B., Vessby, K. & Glimskär, A. (2001). Plants, insects and birds in semi-natural pastures in relation to local habitat and landscape factors. *Biodiversity and Conservation*, 10, 1839–1863.
- Somme, L., Mayer, C., Raspé, O. & Jacquemart, A.L. (2013). Influence of spatial distribution and size of clones on the realized outcrossing rate of the marsh cinquefoil (*Comarum palustre*). *Annals of Botany*, doi : 10.1093/aob/mct280.
- Somme, L., Raabová, J., Jacquemart, A.L. & Raspé, O. (2012). Development and multiplexing of microsatellite markers using pyrosequencing in the clonal plant *Comarum palustre* (Rosaceae). *Molecular Ecology Resources*, 12, 91–97.
- Soomers, H., Karssenbergh, D., Verhoeven, J.T.A., Verweij, P.A. & Wassen, M.J. (2013). The effect of habitat fragmentation and abiotic factors on fen plant occurrence. *Biodiversity and Conservation*, 22, 405–424.
- Sork, V.L., Nason, J., Campbell, D.R. & Fernandez, J.F. (1999). Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 219–224.
- Southwick, E.E. (1984). Photosynthate allocation to floral nectar : a neglected energy investment. *Ecology*, 65, 1775–1779.
- Southwick, E.E., Loper, G.M. & Sadwick, S.E. (1981). Nectar production, composition, energetics and pollinator attractiveness in spring flowers of Western New York. *American Journal of Botany*, 68, 994–1002.

- Sowig, P. (1989). Effects of flowering plant's patch size on species composition of pollinator communities, foraging strategies, and resource partitioning in bumblebees (Hymenoptera : Apidae). *Oecologia*, 78, 550–558.
- Spitzer, K. & Danks, H.V. (2006). Insect biodiversity of boreal peat bogs. *Annual Review of Entomology*, 51, 137–161.
- Standifer, L.N., McCaughey, W.F., Dixon, S.E., Gilliam, M. & Loper, G.M. (1980). Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. II. Protein, amino acids and enzymes. *Apidologie*, 11, 163–171.
- Steffan-Dewenter, I., Münzenberg, U., Bürger, C., Thies, C. & Tscharnkte, T. (2002). Scale-dependent effects on landscape context on three pollinator guilds. *Ecology*, 83, 1421–1432.
- Steffan-Dewenter, I. & Tscharnkte, T. (1999). Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set. *Oecologia*, 121, 432–440.
- Stehlik, I. & Holderegger, R. (2000). Spatial genetic structure and clonal diversity of *Anemone nemorosa* in late successional deciduous woodlands of Central Europe. *Journal of Ecology*, 88, 424–435.
- Stevens, V.M., Turlure, C. & Baguette, M. (2010). A meta-analysis of dispersal in butterflies. *Biological Reviews*, 85, 625–642.
- Stout, J.C. & Goulson, D. (2002). The influence of nectar secretion rates on the responses of bumblebees (*Bombus* spp.) to previously visited flowers. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52, 239–246.
- Strijker, D. (2005). Marginal lands in Europe - causes of decline. *Basic and Applied Ecology*, 6, 99–106.
- Stuefer, J.F. & Huber, H. (1998). Differential effects of light quantity and spectral light quality on growth, morphology and development of two stoloniferous *Potentilla* species. *Oecologia*, 117, 1–8.
- Sugiura, S. (2012). Flower-visiting insect communities on two closely related *Rhododendron* species flowering in different seasons. *Arthropod-Plant Interactions*, 6, 333–344.
- Sundberg, S. (2012). Quick target vegetation recovery after restorative shrub removal and mowing in a calcareous fen. *Restoration Ecology*, 20, 331–338.
- Suyama, Y., Obayashi, K. & Hayashi, I. (2000). Clonal structure in a dwarf bamboo (*Sasa senanensis*) population inferred from amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprints. *Molecular Ecology*, 9, 901–906.

BIBLIOGRAPHIE

- Svensson, B., Lagerlöf, J. & G. Svensson, B. (2000). Habitat preferences of nest-seeking bumble bees (Hymenoptera : Apidae) in an agricultural landscape. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 77, 247–255.
- Svoboda, J.A., Thompson, M.J., Herbert, E.W. & Shimanuki, H. (1980). Sterol utilization in honey bees fed a synthetic diet : analysis of prepupal sterols. *Journal of Insect Physiology*, 26, 291–294.
- Swift, T.L. & Hannon, S.J. (2010). Critical thresholds associated with habitat loss : a review of the concepts, evidence, and applications. *Biological Reviews*, 85, 35–53.
- Taki, H., Okabe, K., Yamaura, Y., Matsuura, T., Sueyoshi, M., Makino, S. & Maeto, K. (2010). Effects of landscape metrics on *Apis* and non-*Apis* pollinators and seed set in common buckwheat. *Basic and Applied Ecology*, 11, 594–602.
- Tanghe, M. & Herremans, J.P. (1990). La gestion des marais de la Haute Semois, in Actes du colloque "Gérer la Nature ?". *Trav. Cons. de la Nature*, 15, 93–112.
- Tanner, J.E. (2001). The influence of clonality on demography : patterns in expected longevity and survivorship. *Ecology*, 82, 1971–1981.
- Tasei, J.N. & Aupinel, P. (2008). Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera : Apidae). *Apidologie*, 39, 397–409.
- Thomas, J.A., Telfer, M.G., Roy, D.B., Preston, C.D., Greenwood, J.J.D., Asher, J., Fox, R., Clarke, R.T. & Lawton, J.H. (2004). Comparative losses of British butterflies, birds, and plants and the global extinction crisis. *Science*, 303, 1879–1881.
- Thompson, H.M. (2001). Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, 32, 305–321.
- Tiley, G.E.D. (2010). Biological flora of the British Isles : *Cirsium arvense* (L.) Scop. *Journal of Ecology*, 98, 938–983.
- Tischendorf, L., Bender, D.J. & Fahrig, L. (2003). Evaluation of patch isolation metrics in mosaic landscapes for specialist vs. generalist dispersers. *Landscape Ecology*, 18, 41–50.
- Torres-Díaz, C., Cavieres, L., Muñoz Ramírez, C. & Arroyo, M. (2007). Consequences of microclimate variation on insect pollinator visitation in two species of *Chaetanthera* (Asteraceae) in the central Chilean Andes. *Revista Chilena de Historia Natural*, 80, 455–468.
- Truscott, A.M., Soulsby, C., Palmer, S.C.F., Newell, L. & Hulme, P.E. (2006). The dispersal characteristics of the invasive plant *Mimulus guttatus* and the ecological significance of increased occurrence of high-flow events. *Journal of Ecology*, 94, 1080–1091.

- Tucker, M. & Koltunow, A. (2009). Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants : molecular, morphological and evolutionary relationships. *Functional Plant Biology*, 36, 490–504.
- UNEP-WCMC (2008). Etat des aires protégées dans le monde, 2007 : bilan annuel des progrès mondiaux en matière de conservation.
- van der Valk, A.G. & Verhoeven, J.T.A. (1988). Potential role of seed banks and understory species in restoring quaking fens from floating forests. *Vegetatio*, 76, 3–13.
- Vallejo-Marín, M., Dorken, M.E. & Barrett, S.C. (2010). The ecological and evolutionary consequences of clonality for plant mating. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41, 193–213.
- Van Belle, J., Barendregt, A., Schot, P.P. & Wassen, M.J. (2006). The effects of groundwater discharge, mowing and eutrophication on fen vegetation evaluated over half a century. *Applied Vegetation Science*, 9, 195–204.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. (2004). Micro-checker : software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
- Van Rossum, F. (2010). Reproductive success and pollen dispersal in urban populations of an insect-pollinated hay-meadow herb. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 12, 21–29.
- Van Rossum, F., Godefroid, S. & Verté, P. (2012). Stabilité de la végétation du marais de Heinsch (Lorraine belge) sur trois décennies. *Dumortiera*, pp. 1–8.
- Van Rossum, F. & Triest, L. (2010). Pollen dispersal in an insect-pollinated wet meadow herb along an urban river. *Landscape and Urban Planning*, 95, 201–208.
- Van Rossum, F. & Triest, L. (2012). Stepping-stone populations in linear landscape elements increase pollen dispersal between urban forest fragments. *Plant Ecology and Evolution*, 145, 332–340.
- Van Rossum, F., Vereecken, N.J., Brédar, E. & Michez, D. (2013). Pollen dispersal and fruit production in *Vaccinium oxycoccos* and comparison with its sympatric congener *V. uliginosum*. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 15, 344–352.
- Vandepitte, K., Honnay, O., Jacquemyn, H. & Roldán-Ruiz, I. (2010). Effects of out-crossing in fragmented populations of the primarily selfing forest herb *Geum urbanum*. *Evolutionary Ecology*, 24, 1353–1364.
- Vandepitte, K., Meyer, T.D., Jacquemyn, H., Roldán-Ruiz, I. & Honnay, O. (2013). The impact of extensive clonal growth on fine-scale mating patterns : a full paternity analysis of a lily-of-the-valley population (*Convallaria majalis*). *Annals of Botany*.

BIBLIOGRAPHIE

- Vanderplanck, M., Leroy, B., Wathélet, B., Wattiez, R. & Michez, D. (2013). Standardized protocol to evaluate pollen polypeptides as bee food source. *Apidologie*, pp. 1–13.
- Vanderplanck, M., Michez, D., Vancraenenbroeck, S. & Lognay, G. (2011). Micro-quantitative method for analysis of sterol levels in honeybees and their pollen loads. *Analytical Letters*, 44, 1807–1820.
- Vange, V. (2002). Breeding system and inbreeding depression in the clonal plant species *Knautia arvensis* (Dipsacaceae) : implications for survival in abandoned grassland. *Biological Conservation*, 108, 59–67.
- Veeneklaas, R., Bockelmann, A., Reusch, T. & Bakker, J. (2011). Effect of grazing and mowing on the clonal structure of *Elytrigia atherica* : a long-term study of abandoned and managed sites. *Preslia*, 83, 455–470.
- Verhoeven, J.T.A., Kemmers, R.H. & Koerselman, W. (1993). Nutrient enrichment of freshwater wetlands. In : *Landscape Ecology of a Stressed Environment* (eds. Vos, C.C. & Opdam, P.). Springer Netherlands, pp. 33–59.
- Verté, P. (2007). Les marais de la Haute-Semois, 40 années de conservation d'un site de très grand intérêt biologique. *Echo des Réserves*, 3, 4–9.
- Vervoort, A., Cawoy, V. & Jacquemart, A.L. (2011). Comparative reproductive biology in co-occurring invasive and native *Impatiens* species. *International Journal of Plant Sciences*, 172, 366–377.
- Viana, B.F., Boscolo, D., Mariano Neto, E.m.c., Lopes, L., Lopes, A., Ferreira, P., Pigozzo, C.M. & Primo, L. (2012). How well do we understand landscape effects on pollinators and pollination services ? *Journal of Pollination Ecology*, 7.
- Vogler, D.W. & Kalisz, S. (2001). Sex among the flowers : the distribution of plant mating systems. *Evolution ; international journal of organic evolution*, 55, 202–204.
- Waller, D.M. (1984). Differences in fitness between seedlings derived from cleistogamous and chasmogamous flowers in *Impatiens capensis*. *Evolution*, 38, 427–440.
- Walther-Hellwig, K. & Frankl, R. (2000). Foraging habitats and foraging distances of bumblebees, *Bombus* spp. (Hym., Apidae), in an agricultural landscape. *Journal of Applied Entomology*, 124, 299–306.
- Waples, R.S. & Gaggiotti, O. (2006). Invited review : what is a population ? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15, 1419–1439.
- Waser, N.M. (1986). Flower constancy : definition, cause, and measurement. *The American Naturalist*, 127, 593–603.

- Waser, N.M., Chittka, L., Price, M.V., Williams, N.M. & Ollerton, J. (1996). Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77, 1043–1060.
- Waser, N.M. & Ollerton, J. (2006). *Plant-pollinator interactions : from specialization to generalization*. University of Chicago Press, Chicago.
- Weiner, C.N., Hilpert, A., Werner, M., Linsenmair, K.E. & Blüthgen, N. (2010). Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie*, 41, 476–487.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Wesselingh, R.A. (2007). Pollen limitation meets resource allocation : towards a comprehensive methodology. *New Phytologist*, 174, 26–37.
- Westphal, C., Steffan-Dewenter, I. & Tscharntke, T. (2006). Foraging trip duration of bumblebees in relation to landscape-wide resource availability. *Ecological Entomology*, 31, 389–394.
- Westrich, P. (1996). Habitat requirements of central European bees and the problems of partial habitats. *The Conservation of Bees*, pp. 1–16.
- Wheeler, B.D. (1995). Restoration of temperate wetlands. In : *Restoration of temperate wetlands*. Wiley, University of Sheffield.
- Wheeler, B.D. & Proctor, M.C.F. (2000). Ecological gradients, subdivisions and terminology of North-West European mires. *Journal of Ecology*, 88, 187–203.
- Wheelwright, N.T., Dukeshire, E.E., Fontaine, J.B., Gutow, S.H., Moeller, D.A., Schuetz, J.G., Smith, T.M., Rodgers, S.L. & Zink, A.G. (2006). Pollinator limitation, autogamy and minimal inbreeding depression in insect-pollinated plants on a boreal island. *American Midland Naturalist*, 155, 19–38.
- Whittington, W.J., Wilson, G.B. & Humphries, R.N. (1988). The germination characteristics of seeds from *Lychnis viscaria* L. (*Viscaria vulgaris* Bernh.), *Potentilla rupestris* L. and *Veronica spicata* L. *New Phytologist*, 109, 505–514.
- Widén, B., Cronberg, N. & Widén, M. (1994). Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia Geobotanica*, 29, 245–263.
- Wilcock, C. & Neiland, R. (2002). Pollination failure in plants : why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science*, 7, 270–277.
- Wilcove, D.S., Rothstein, D., Dubow, J., Phillips, A. & Losos, E. (1998). Quantifying threats to imperiled species in the United States. *BioScience*, 48, 607–615.

BIBLIOGRAPHIE

- Williams, C.F. (2007). Effects of floral display size and biparental inbreeding on outcrossing rates in *Delphinium barbeyi* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 94, 1696–1705.
- Williams, C.F., Ruvinsky, J., Scott, P.E. & Hews, D.K. (2001). Pollination, breeding system, and genetic structure in two sympatric *Delphinium* (Ranunculaceae) species. *American Journal of Botany*, 88, 1623–1633.
- Williams, N.M. (2011). Restoration of nontarget species : bee communities and pollination function in riparian forests. *Restoration Ecology*, 19, 450–459.
- Williams, P.H., Araújo, M.B. & Rasmont, P. (2007). Can vulnerability among British bumblebee (*Bombus*) species be explained by niche position and breadth ? *Biological Conservation*, 138, 493–505.
- Winfree, R. (2010). The conservation and restoration of wild bees. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195, 169–197.
- Winfree, R., Aguilar, R., Vázquez, D.P., LeBuhn, G. & Aizen, M.A. (2009). A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, 90, 2068–2076.
- Winn, A.A., Elle, E., Kalisz, S., Cheptou, P., Eckert, C.G., Goodwillie, C., Johnston, M.O., Moeller, D.A., Ree, R.H., Sargent, R.D. & Vallejo-Marín, M. (2011). Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. *Evolution*, 65, 3339–3359.
- de Witte, L.C. (2011). Longevity of arctic and alpine clonal plants - inaugural dissertation.
- de Witte, L.C. & Stocklin, J. (2010). Longevity of clonal plants : why it matters and how to measure it. *Annals of Botany*, 106, 859–870.
- Young, A., Boyle, T. & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 413–418.
- Young, H.J., Dunning, D.W. & Hasseln, K.W.v. (2007). Foraging behavior affects pollen removal and deposition in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *American journal of botany*, 94, 1267–1271.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation : a review. *Molecular ecology*, 11, 1–16.
- Zerbe, S., Steffenhagen, P., Parakenings, K., Timmermann, T., Frick, A., Gelbrecht, J. & Zak, D. (2013). Ecosystem service restoration after 10 years of rewetting peatlands in NE Germany. *Environmental Management*, 51, 1194–1209.

- Zurbuchen, A., Bachofen, C., Mller, A., Hein, S. & Dorn, S. (2010). Are landscape structures insurmountable barriers for foraging bees ? A mark-recapture study with two solitary pollen specialist species. *Apidologie*, 41, 497–508.
- Zuur, A., Ieno, E.N., Walker, N., Saveliev, A.A. & Smith, G.M. (2009). *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. 1st edn. Springer.
- Zych, M., Goldstein, J., Roguz, K. & Stpiczyńska, M. (2013). The most effective pollinator revisited : pollen dynamics in a spring-flowering herb. *Arthropod-Plant Interactions*, 7, 315–322.