N° d'identification |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

UNIVERSITE MONTPELLIER II

SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie des Populations et Ecologie

Formation : Doctorale : Biologie de l'Evolution et Ecologie

Ecole Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés - Agronomie-Environnement

Impact de la progression forestière sur les espèces rares de milieu ouvert : écologie et dynamique des populations de la Pivoine officinale (*Paeonia officinalis* L.)

Présentée et soutenue publiquement par

Emilie Andrieu

le 15 Juin 2006

JURY

François BRETAGNOLLE, Professeur, INRA Dijon	Rapporteur
Frédéric MEDAIL, Professeur,IMEP, CNRS Aix-en-Provence	Rapporteur
Bruno COLAS, Chargé de Recherche, MNHN Paris	Examinateur
Maria Begonia GARCIA, Chargée de Recherche, CSIC, Espagne	Examinateur
Bernard GODELLE, Professeur, Université Montpellier II	Examinateur
Max DEBUSSCHE, Directeur de Recherche, CNRS Montpellier	Directeur de thèse

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION **1**

1.1 Dynamique des espèces végétales en milieu hétérogène et changeant 3

1.2 Impact de l'homme sur la variabilité spatio-temporelle des paysages 5

1.3 Les espèces menacées : comment les étudier et quel modèle choisir ? 5

1.4 Système étudié 11

1.4.1. La Pivoine officinale 11

1.4.2. Les sites d'étude 15

1.5 Objectifs de la thèse 17

II. DEMOGRAPHIE ET DYNAMIQUE EN MILIEU HETEROGENE **21**

2.1 Introduction 23

2.2 Méthodologie 25

2.3 Suivi des populations 29

2.3.1 Structure démographique des populations 29

2.3.2 Dynamique des populations 31

2.4 Expérimentations : ombrage des individus et ouverture du milieu 57

2.4.1 Impact de la réduction de l'intensité lumineuse 57

2.4.2 Impact de la ré-ouverture du milieu 59

III. IMPACTS SUR LE CYCLE DE VIE **67**

3.1 La reproduction 71

3.1.1 Contexte 71

3.1.2 Auto-incompatibilité et dépression de consanguinité 75

3.1.3 Limitation des transferts de pollen 79

3.1.4 Effet de la taille sur la reproduction 83

3.2 Prédation et Dissémination 91

3.2.1 Contexte 91

3.2.2 Prédation des graines non mûres 95

3.2.3 Prédation et dissémination des graines mûres 101
3.2.4 Herbivorie 109
3.3 Recrutement des plantules 115
3.3.1 Contexte 115
3.3.1. Type de dormance et conséquences démographiques 117
3.3.2 Germination et établissement des plantules 123

IV. QUELLE GESTION POUR LES ESPECES PERENNES LONGEVIVES ? 131
4.1 La population, élément de gestion pertinent 133
4.2. quelle gestion du milieu ? 133
4.3 Réintroductions et renforcements 139

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 145
5.1. Impact de la fermeture forestière 147
5.2. Trois approches complémentaires :
dynamique, cycle de vie et gestion Expérimentale 149
5.3. L'importance des sources de variabilité 153
5.3.1. La variabilité spatiale 153
5.3.2. La variabilité temporelle 157
5.3.3. Fragmentation et risques d'extinctions locales 157
5.4. Les plantes pérennes longévives et la niche de persistance 159

BIBLIOGRAPHIE 163

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1
Détail des données de démographie

Annexe 2.1
The impact of forest spread on a marginal population of a protected peony (*Paeonia officinalis* L.): the importance of conserving the habitat mosaic
Emilie Andrieu, John Thompson et Max Debussche
Biodiversity and conservation, *sous presse*

Annexe 2.2
Size-dependent reproduction and gender modification in the hermaphroditic perennial plant *Paeonia officinalis*
Emilie Andrieu, Max Debussche et John Thompson
Soumis

Annexe 2.3
Exploring the limitations on maternal fertility in perennial plants: a three year experimental study of the protected *Paeonia officinalis* in southern France
Emilie Andrieu, Max Debussche, Marta Galloni et John Thompson
En préparation

Annexe 2.4
Diaspore removal and potential dispersers of the rare and protected *Paeonia officinalis* L. in an heterogeneous landscape
Emilie Andrieu et Max Debussche
En préparation

Partie I

Introduction

1.1 DYNAMIQUE DES ESPÈCES VÉGÉTALES EN MILIEU HÉTÉROGÈNE ET CHANGEANT

Les conditions biotiques et abiotiques des milieux présentent une variabilité spatio-temporelle (perturbations et successions secondaires, conditions climatiques, substrat, …) qui conduit à l'échelle du paysage à une mosaïque dynamique de taches de végétation ayant des compositions et des structures différentes. Les réponses des espèces à cette variabilité dépendent de leurs traits d'histoire de vie. La théorie des traits d'histoire de vie postule l'existence de compensations entre traits (Bell et Koufopanou 1986) : ainsi, sur la quantité de ressources disponibles une année donnée, une fraction sera investie dans la survie et l'autre dans la reproduction. Chez les espèces annuelles, les ressources sont allouées entièrement à la reproduction puisque les individus meurent dans l'année. La persistance locale des populations dépend alors uniquement du recrutement, et donc de la disponibilité en micro-sites favorables. En revanche, chez les plantes pérennes, une partie des ressources est allouée à la survie afin de permettre la persistance locale de la population. Chaque évènement de reproduction peut donc infliger des coûts en terme de survie aux individus.

Les espèces annuelles et pérennes auront ainsi des réponses différentes aux variations temporelles des conditions du milieu. Chez une espèce annuelle, une dégradation des conditions environnementales conduit immédiatement à un déclin de la population. La persistance dépend alors de la présence d'une banque de graines permettant d'attendre un retour de conditions plus favorables (Fischer et Matthies 1998). La dissémination des graines permet elle la colonisation de nouveaux sites favorables et donc la persistance régionale de l'espèce (fonctionnement en méta-populations). Chez une espèce pérenne, la longue durée de vie et la très forte survie des adultes permettent une forte persistance locale durant des périodes défavorables (Eriksson 1996). Il existe donc un délai , appelé inertie (Summerfield 1972), entre le moment où les conditions se dégradent et celui où la population décroît.

Ainsi, la distribution géographique d'une espèce dépend à la fois de ses capacités de dissémination, de sa persistance locale et de l'hétérogénéité spatio-temporelle du milieu. Ceci peut expliquer que la distribution d'une espèce ne corresponde pas forcément à la distribution des habitats qui lui sont favorables (Pulliam 2000). En effet, une espèce peut être présente dans un habitat défavorable du fait du délai de réponse aux changements de l'habitat ou bien si le flux de propagules est suffisamment important pour permettre la persistance d'individus dans un habitat défavorable (fonctionnement en source-puis, Eriksson 1996). Inversement, une espèce peut être absente d'un habitat favorable si le flux de propagules est insuffisant pour permettre sa colonisation.

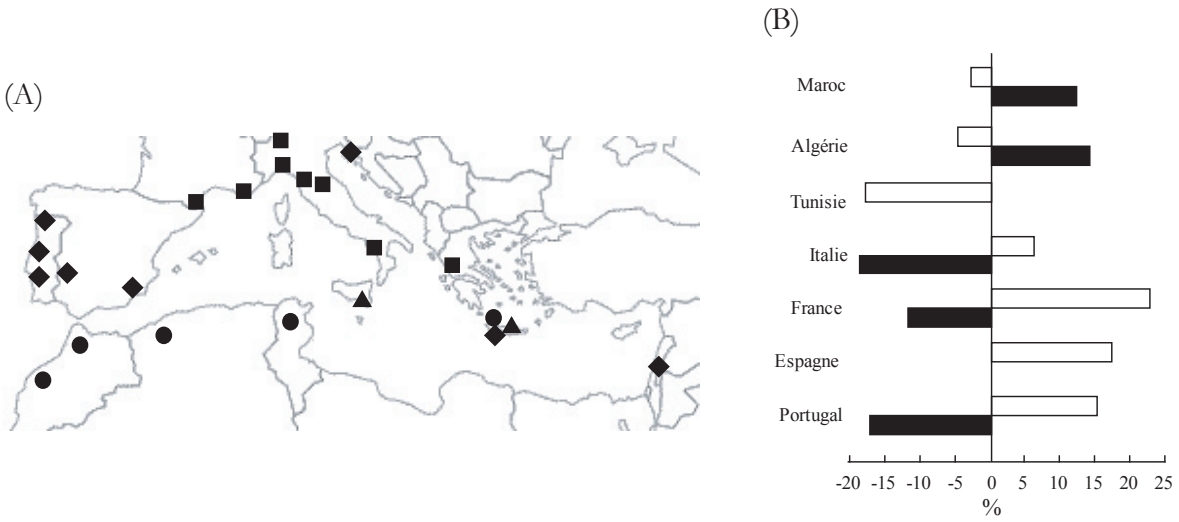
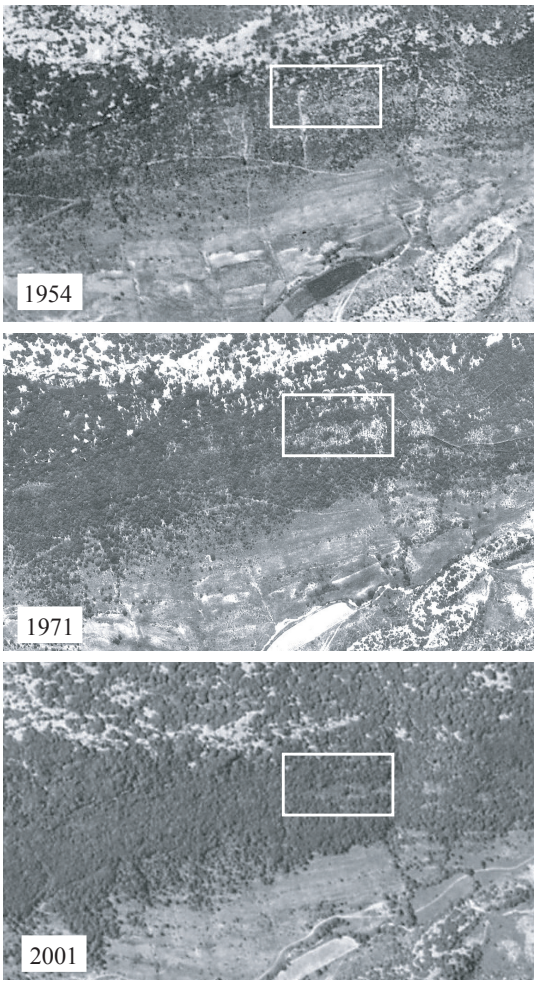


Figure 1.1. Changements d'utilisation des terres dans le bassin méditérranéen et ses marges. A) Synthèse des changements de paysages à partir de 23 études de cas (Mazzoleni et al. 2004) : ▲ = stabilité, ● = déforestation (due à l'élevage, l'agriculture et les coupes de bois), ♦ = reboisements, ■ = reforestation suite à la déprise agricole. B) Pourcentage de variations des surfaces boisées (blanc) et surfaces cultivées (noir) entre 1965 et 1976 dans 7 pays méditerranéens (Tatoni et al. 2004).



Date	Recouvrement en arbres et buissons hauts (%)	Utilisation
1946	54	pâturage
1949	ca. 0	coupes
1954	44	pâturage
1971	52	pâturage
2001	62	abandon

Figure 1.2. Changements de la physionomie de la végétation et de l'utilisation des terres sur le site d'étude du Pic-Saint-Loup, entre 1946 et 2001 (photographies aériennes IGN).

1.2 IMPACT DE L'HOMME SUR LA VARIABILITÉ SPATIO-TEMPORELLE DES PAYSAGES

Les activités humaines sont une composante clef de l'étude des impacts de l'hétérogénéité spatio-temporelle sur la dynamique des populations des espèces rares. En effet, celles-ci structurent les paysages (Vitousek *et al.* 1997, Ollson *et al.* 2000), et ce depuis le Néolithique dans la région méditerranéenne (di Pasquale *et al.* 2004). Par ailleurs, les changements d'utilisation des terres sont la cause principale de l'actuelle érosion de la biodiversité (Sala *et al.* 2000). Dans le bassin méditerranéen et en Europe, on observe ainsi deux grandes tendances dépendantes du contexte socio-économique (figure 1.1) (Mazzoleni *et al.* 2004). La partie Sud du bassin méditerranéen est menacée par la déforestation causée par l'intensification de l'élevage, de l'agriculture et de l'utilisation du bois (Mazzoleni *et al.* 2004). Par contre, on assiste à une progression des espèces ligneuses remarquable par son étendue et sa rapidité dans la partie Nord du bassin méditerranéen (Debussche *et al.* 1987, Lepart et Debussche 1992) et plus largement dans les zones de moyenne montagne en Europe (Delcros 1994, André 1998) (figure 1.2). Cette profonde modification des paysages est générée par deux mécanismes qui ont débuté au XIXe siècle et se sont accélérés à partir de la moitié du XXe siècle. D'une part, on assiste à la diminution importante de la surface exploitée (déprise agricole) : par exemple, en région Provence-Alpes-Côte d'Azur, la Surface Agricole Utilisée a été divisée par trois entre 1960 et aujourd'hui (Tatoni *et al.* 2004). Ainsi, dans les surfaces laissées à l'abandon, la succession naturelle conduit à la colonisation des pelouses par les espèces ligneuses et les nombreux taillis exploités pour l'industrie verrière et le charbonnage ont rejeté de souche. D'autre part les zones encore exploitées connaissent une mutation des systèmes agraires : le système traditionnel agro-sylvo-pastoral qui maintenait une mosaïque d'habitats différents est abandonné et remplacé par une agriculture plus intensive (en particulier la viticulture) et des reboisements importants.

L'augmentation du couvert forestier a des impacts importants sur le fonctionnement des écosystèmes (Debussche *et al.* 1987), mais aussi sur le fonctionnement des populations de plantes herbacées de milieu ouvert, de clairières ou de lisière (Barkham 1980, 1980, Barbero *et al.* 1990, Valverde et Silvertown 1998, Walck *et al.* 1999). Or, la majorité des espèces rares et endémiques de la zone méditerranéenne sont des espèces de milieu ouvert, les espèces forestières étant des espèces communes de la zone euro-sibérienne (Preiss *et al.* 1997, Lavergne *et al.* 2005, Thompson 2005), et elles sont donc particulièrement menacées (e.g. Médail *et al.* 2002, Ne'eman 2003).

1.3 LES ESPÈCES MENACÉES : COMMENT LES ÉTUDIER ET QUEL MODÈLE CHOISIR ?

L'homme est à l'origine de la 6ème grande crise d'extinction des espèces (Ehrlich et Wilson 1991) et à l'origine du domaine qui l'étudie : les sciences de la conservation. Ce domaine possède un champ disciplinaire large, incluant en particulier les sciences sociales, la géographie, l'écologie et l'évolution, et rassemble des problématiques fondamentales (par exemple l'étude de l'endémisme)

et appliquées (par exemple la définition de stratégies de gestion).

Cette thèse s'intègre dans les domaines de l'écologie et de la biologie de la conservation, dont les objectifs sont d'identifier les espèces / communautés / écosystèmes menacés et d'acquérir des connaissances sur leur biologie, écologie et fonctionnement (Soulé 1985). Comprendre les processus conduisant à la raréfaction et l'extinction des espèces consécutives aux changements environnementaux imposés par l'homme est un élément clef de cette démarche et de tout programme de conservation d'une espèce (Horvitz et Schemske 1995). Pour cela, deux approches complémentaires (Caughley 1994, Hedrick *et al.* 1995, Norris 2004) doivent être prises en compte. La première concerne les causes et modalités du déclin de l'espèce, c'est-à-dire comment les traits d'histoire de vie sont affectés par les changements environnementaux et comment les individus répondent à ces changements. La seconde concerne la relation entre faibles effectifs et viabilité des populations, c'est-à-dire les risques spécifiques encourus par ce type de population.

En 1977, Grubb a défini la niche de régénération d'une espèce comme étant "*an expression of the requirements for a high chance of success in the replacement of one mature individual by a new mature individual of the next generation*". Créé a l'origine pour comprendre le maintien de la diversité spécifique dans les communautés végétales, ce concept permet de caractériser les conditions écologiques qui régissent chaque composante du cycle de vie d'une espèce, c'est-à-dire la production des graines (floraison, pollinisation, maturation des graines), la dissémination (dans le temps et dans l'espace), la germination, l'établissement et la croissance des individus. Il permet donc aussi de quantifier l'impact des changements environnementaux sur les populations d'une espèce donnée. Ainsi, chaque composante du cycle de vie pouvant avoir des exigences écologiques qui lui sont propre, chacune peut présenter une sensibilité différente aux changements des conditions environnementales et être déterminante dans le processus de réduction d'effectif d'une population. Comprendre les causes et modalités du déclin des populations d'une espèce et prévoir leurs changements nécessitent donc l'étude du cycle de vie dans sa globalité. Enfin, le trajet des individus dans le cycle de vie dépendant à la fois de facteurs environnementaux et génétiques (Schemske *et al.* 1994), l'impact des changements des conditions environnementales transparaît dans la dynamique des populations.

La France possède une longue liste d'espèces végétales protégées : un quart des 4900 espèces spontanées de phanérogames et de cryptogames vasculaires inventoriées dans la flore de France est protégé au niveau national ou au niveau régional et une espèce sur dix est prioritaire dans le Livre rouge de la flore menacée. Seul un très petit nombre de ces espèces protégées et/ou menacées a bénéficié de recherches détaillées qui permettent d'envisager leur conservation avec succès. En ce qui concerne la majorité des autres espèces, les connaissances restent insuffisantes et il est impossible de toutes les étudier en détail, faute de temps et de moyens ou parce que leurs caractéristiques biologiques rendent leur étude difficile. Le but de cette étude est de comprendre par quels mécanismes des changements de conditions environnementales affectent les populations et donc de dégager des conclusions générales pouvant être applicables tout un groupe d'espèces. Dans ce contexte, le choix d'une espèce modèle est déterminé par trois types de contraintes : la

Herbacées 83.0 %						Ligneux 17.0 %	
Annuelles	Monocarpiques	Polycarpiques57.9%				Polycarpiques	
Thérophytes 22.0 %	Hémi-cryptophytes 3.1 %	Hydrophytes 5.4 %	Géophytes 23.8 %	Hémi-cryptophytes 23.3 %	Chaméphytes 5.4 %	Chaméphytes 8.5 %	Phanéro-phytes 8.5 %

Tableau 1.1. Types biologiques des espèces rares (protégées au niveau national, régional ou dans le livre rouge) de la région Languedoc-Roussillon (% d'espèces de chaque type biologique).

Pelouses frutiçaies	Mer et littoral	Falaises, éboulis, rochers	Eaux douces, berges, alluvions	Marais et tourbières	Forêts	Cultures et friches
40.4 %	14.4 %	13.8 %	13.0 %	9.9 %	4.9 %	3.6 %

Tableau 1.2. Habitats caractéristiques des espèces rares (protégées au niveau national, régional ou dans le Livre Rouge) de la région Languedoc-Roussillon (% d'espèces de chaque habitat).

Fermeture ligneuse	Drainage, aménagement hydraulique	Urbanisation	Aménagements forestiers	Divers	Pas de menaces
67.2 %	30.5 %	13.0 %	6.7 %	1.8 %	11.7 %

Tableau 1.3. Menaces pesant sur les espèces rares (protégées au niveau national, régional ou dans le livre rouge) de la région Languedoc-Roussillon (% d'espèces dans chaque type de menace). Le total est > 100 % car il peut y avoir plusieurs menaces pour une espèce.

représentativité de l'espèce, les contraintes liées à l'étude scientifique, et celles liées aux financements. Cette démarche va être illustrée par le cas de la flore de la région Languedoc-Roussillon (L-R), pour laquelle de nombreuses données sont disponibles, et qui correspond à la région d'étude de la thèse.

- L'espèce modèle doit par définition être représentative d'un groupe d'espèces à protéger, c'est-à-dire de leurs caractéristiques biologiques (traits d'histoire de vie), de leur habitat et du type de menace qu'elles encourent. Le type biologique peut être une bonne approximation des traits d'histoire de vie. Les géophytes constituent la majorité des espèces rares en zone méditerranéenne et en France (23.8% des 427 espèces de phanérogames et fougères terrestres du L-R protégées au niveau national ou régional ou présentes dans le Livre Rouge, tableau 1.1). L'habitat de ces espèces rares le plus représenté est les pelouses et frutiçaies (40,4% de la surface du L-R, tableau 1.2). La combinaison type biologique*habitat la plus représentée est celle des géophytes de milieu ouvert. Enfin, le type de menace encourue doit lui aussi être commun à un grand nombre : il correspond en L-R à la fermeture forestière et aux aménagements hydrauliques (tableau 1.3).

- Par définition, les espèces rares ont des effectifs faibles et/ou peu de populations. Or, les études scientifiques, basées sur l'expérimentation et l'analyse statistique, nécessitent des tailles d'échantillons suffisantes. Le choix du modèle biologique doit donc se porter sur une espèce rare ayant des effectifs suffisants, ou sur une espèce en cours de raréfaction. Une autre contrainte est liée à la facilité à étudier l'espèce et à mettre en place des expérimentations permettant de fournir des données précises : il est préférable de choisir une espèce relativement facile à suivre et à manipuler, par exemple une espèce dont les individus sont facilement différenciables pour les suivis démographiques, une espèce dont les fleurs et les graines sont faciles à compter, etc.

- L'étude et la gestion des populations ont un coût élevé. Or il est en général plus facile de trouver des financements pour les espèces ayant un intérêt économique ou pour lesquelles il existe une responsabilité patrimoniale. Trois cas se présentent alors : (1) par chance, l'espèce en question est un bon modèle et les résultats de l'étude pourront être généralisés, (2) l'espèce en question n'est pas un bon modèle mais elle est typique d'un écosystème menacé et sa protection profitera à tout l'écosystème, telle une espèce indicatrice, enfin (3) l'espèce en question n'est ni dans le premier ni dans le second cas et la portée de son étude et de sa gestion est limitée à elle-même : ceci ne sous-entend pas que son étude et sa gestion ne sont pas légitimes, mais cela fait encourir le risque de mener une étude de cas qui ne permet pas de mettre en évidence des patrons généraux.

Dans le cadre de la thèse, le choix du modèle s'est porté sur une espèce géophyte de milieu ouvert menacée par la progression forestière. Parmi les espèces candidates, *Paeonia. officinalis* a été choisie pour son statut d'espèce emblématique et son statut de protection. L'étude des plantes pérennes polycarpiques est difficile car leurs cycles de vie sont complexes et la durée de vie des individus excède souvent la durée des expérimentations. Cette thèse présente les résultats des trois premières années d'un suivi de *P. officinalis*, initié dans l'optique d'un projet à long terme.

Figure 1.3. La Pivoine officinale et son milieu. De haut en bas et de gauche à droite : 1) racines tubéreuses, 2) individu reproducteur d'une tige, 3) plantules, 4) fleur avec deux carpelles, 5) Hyménoptère passant sur les stigmates en collectant le pollen, 6) follicules après leur déhiscence, exposant les graines, 7) habitat caractéristique en milieu ouvert (VIS), 8) individus végétatifs en sous-bois d'un taillis de Chêne Vert (STF).

1.4 SYSTÈME ÉTUDIÉ

1.4.1. La Pivoine officinale

La Famille des *Paeoniaceae* comprend environ 35 espèces d'herbacées pérennes et de ligneuses (Halda et Waddick 2004). Trois sections taxonomiques sont reconnues dans le genre *Paeonia* : la section *Onaepia* comprenant les deux espèces herbacées américaines, la section *Moutan* comprenant les espèces arbustives présentes en Asie, et la section *Paeonia* comprenant les espèces herbacées d'Europe, Asie et Afrique du Nord. La Pivoine officinale (*P. officinalis* L.) fait partie de cette dernière section, et se trouve en Europe centrale et Europe du Sud (Tutin et al., 1993). Parmi les quatre sous-espèces reconnues par Flora Europaea, dont la réalité taxonomique est discutable (Schmitt 1998), le taxon étudié est *P. officinalis subsp microcarpa* (dans la suite du texte, uniquement le nom d'espèce sera utilisé). En France, l'aire de distribution de l'espèce s'étend de l'est des Pyrénées au sud des Alpes en passant par les contreforts du Massif Central. C'est une espèce de milieux ouverts de moyenne montagne, que l'on peut trouver dans des éboulis, pelouses et frutiçaies rocailleuses, clairières, lisières et sous-bois clairs.

La pivoine officinale est une herbacée polycarpique à longue durée de vie (plusieurs dizaines d'années en culture). Cette espèce est géophyte: les tiges apparaissent en Mars à partir de bourgeons situés sur les racines juste sous la surface du sol (ceux-ci pouvant affleurer dans les zones soumises à érosion), et sèchent à la fin de l'été. Ses racines tubéreuses constituent son organe de réserve. Les individus peuvent produire jusqu'à une dizaine de tiges et atteindre 70 cm de hauteur. Les individus reproducteurs peuvent produire une à dix tiges florifères, chacune portant une unique fleur hermaphrodite terminale. La floraison a lieu de mi-Avril à mi-Mai sur les sites d'étude, chaque fleur ayant une durée de vie d'environ six jours. Les fleurs sont de grande taille (diamètre d'une dizaine de cm), ont 5-10 pétales roses, une couronne de 80-300 anthères jaune vif, entourant 1-4 carpelles. Ces fleurs voyantes attirent des pollinisateurs généralistes, principalement de gros hyménoptères (e.g. *Bombus sp. pl.)* qui collectent le pollen. Les follicules déhiscent en Juillet, et exposent chacun jusqu'à 20 graines ovoïdes noires, d'une longueur de 7-9 mm, contrastant avec l'intérieur rougeâtre des follicules. Le tégument externe de la graine est charnu (anatomiquement un faux arille), mais cette partie sèche totalement dans la semaine suivant la déhiscence des carpelles (figure 1.3).

Les Pivoines sont exploitées depuis longtemps, principalement en Asie, pour leur intérêt horticole et pharmaceutique (Bézanger-Beauquesne *et al.* 1980, Leung et Foster 1996, Bruneton 1999). La Pivoine officinale, comme les autres espèces de Pivoines, a été utilisée dès l'Antiquité pour ses qualités pharmaceutiques, principalement pour lutter contre l'épilepsie et comme antispasmodique (Fournier 1948, Leung et Foster 1996). Elle présente un intérêt horticole certain mais la pression d'arrachage dans la région d'étude semble faible aujourd'hui, sans doute due à son statut de protection et au fait que les sites dans lesquels on peut trouver la plante sont difficiles d'accès. Dans la région d'étude, une exploitation des graines est reportée, sans doute pour la teinture ou la confection de colliers contre les convulsions (Durand-Tullou 1995), mais a été totalement abandonnée. Aujourd'hui, la principale menace pesant sur cette espèce semble être la raréfaction de son habitat due à l'augmentation de la couverture forestière consécutive aux

Sites	Localisation	Altitude (m)	Orientation	P	T (min / max)	Lithologie	Climat
Pic-Saint-Loup (***PSL***)	43° 46' N 3° 46' E	300-350	N	1200	-0.7 / 27.8	calcaire	Méditerranéen humide à hivers froids
Saint-Florent-sur-Auzonnet (***SFL***)	44° 14' N 4° 07' E	450	N à NE	1050	0.4 / 31.1	calcaire	Méditerranéen humide à hivers froids
Vissec , Les Plantiers (***VIS***)	43° 54' N 3° 27' E	550	N à NO	1550	-2.7 / 25.9	calcaire	Méditerranéen perhumide à hivers froids
Montagne de la Serrane (Le Coulet)	43° 49' N 3° 33' E	500-650	SO et NO	1550	-2.7 / 25.9	calcaire	Méditerranéen perhumide à hivers froids
Puech du Lion (***TAU***)	43°46' N 3°01'E	720-800	S	1570	-1.5 / 24.5	schiste	climat de transition méditerranéen-océanique à hivers froids

Figure 1.4. Localisation des populations de Pivoine officinale dans le sud du Massif Central (étoiles jaunes), et localisation et caractéristiques physiques des sites d'étude (étoiles rouges). Les précipitations moyennes annuelles (P, en mm) et les températures moyennes des maximums quotidiens du mois le plus chaud et moyenne des minimum quotidines du mois le plus froid (T, en °C) ont été calculés sur une période de 27-32 ans selon les sites (station météorologiques de Saint-Martin de Londres pour PSL, Saint-Christol les Alès pour STF, Saint-Maurice de Navacelle pour VIS et Le Coulet, et Roqueredonde pour TAU. La classification climatique est d'après Daget (1977).

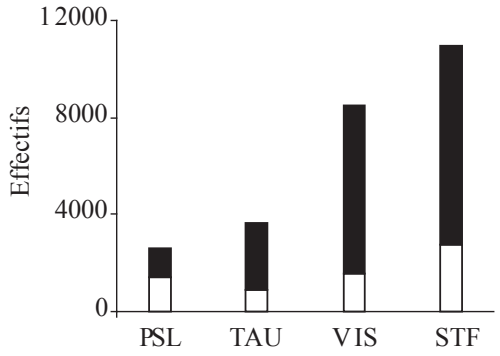


Figure 1.5. Estimations des effectifs totaux de chaque population, en milieu fermé (noir) et milieu ouvert (blanc) : le calcul est fait à partir du nombre d'individus recensés sur la superficie couverte par les transects et ramené à la surface de la population (A VIS, il y a plusieurs populations ; il ne s'agit ici que de la population des plantiers).

PSL	Exploitation du Chêne vert *(Quercus ilex* L.) en taillis ; dernière coupe vers 1950 ; arrêt du pâturage vers 1970. Densification du taillis et lente colonisation des clairières par des buissons et arbustes.
VISS	Exploitation du Chêne pubescent (*Quercus humilis* Mill.) en taillis ; dernière cuope avant 1948, probablement à la fin de la 2e guerre mondiale. Date de l'arrêt du pâturage inconnue, probablement vers 1980. Densification du taillis et colonisation des milieux ouverts par les ligneux.
STF	Exploitation du Chêne vert en taillis ; la majeure partie a été coupée vers 1940 et une coupe récente date de1996. Densification du taillis.
TAU	Reboisement en Sapin Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Mirbel) réalisé en 1971 sur des landes pâturées et des taillis de Chêne rouvre (*Quercus petrae* Liebl.). Le reboisement domine d'étroites interbandes de taillis caducifolié et est mitoyen d'une parcelle de taillis de Chêne rouvre. Une interbande a été coupée en 1999 et est maintenue ouverte, une autre a été coupée pour l'expérimentation en hiver 2003.

Tableau 1.5. Historique des pratiques culturales sur les sites d'étude (les dates sont obtenues par les observations de photos aériennes et l'estimation des âges des arbres sur les sites (dendrochronologie).

	Milieu fermé	Milieu ouvert
PSL	Taillis de Chêne vert *(Quercus ilex* L.), hauteur 3.5-6.5 m ; sous-bois à couverture herbacée très faible, dominé par le Buis (*Buxus sempervirens* L.)	Pelouse pierreuse sèche en partie envahie par des ligneux, majoritairement par le Buis et l'Amélanchier (*Amelanchier ovalis* Medik.), hauteur 1-3 m.
	12 quadrats (150)	18 quadrats (285)
VIS	Taillis de Chêne pubescent (*Quercus humilis* Mill.), hauteur 6-12 m ; sous-bois à couverture herbacée très faible, dominé par le Cornouiller sanguin (*Cornus sanguinea* L.)	Pelouse pierreuse sèche avec des bosquets de ligneux dominés par le Buis, l'Amélanchier, l'Aubépine (*Crataegus monogyna* Jacq.), le Chêne pubescent et l'Alisier (*Sorbus aria* L.), hauteur 1.5-6 m.
	17 quadrats (348)	9 quadrats (292)
STF	Taillis de Chêne vert, hauteur 6-9 m ; sous-bois à couverture herbacée très faible, dominé par le Fragon petit-houx (*Ruscus aculeatus* L.)	Mosaïque de pelouse sèche, ligneux bas (e.g. Amélanchier, *Prunus mahaleb* L.) et rejets de souche de Chêne vert résultant d'une coupe récente du taillis, hauteur 1-2 m.
	12 quadrats (229)	7 quadrats (247)
TAU	Plantation de Sapin Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Mirbel), par bandes rectilignes séparées par d'étroites interbandes de feuillus d'origine : (Noisetier (*Corylus aveleana* L.), Alisier, Frêne commun (*Fraxinus excelsior* L.) et Chêne Rouvre), hauteur 3-20m, sous bois inexistant ; taillis de Chêne Rouvre contigu à la plantation.	Coupe d'une interbande de feuillus, maintenue ouverte, avec un fort recouvrement de Ronces (*Rubus ulmifolius* Schott.) et de Fougères aigle (*Pteridium aquilinum* L.), hauteur 0.5-1m
	13 quadrats, dont 5 à la lisière du taillis (132)	9 quadrats (77)
	Expérimentation Une interbande de feuillus a été coupée à blanc en hiver 200312 quadrats (128)	
Le Coulet		Mosaïque de pelouse, de Chênes pubescents et de buissons (dominés par le Buis, l'Amélanchier, *Viburnum lantana* L. et *Prunus mahaleb* L.)

Tableau 1.6. Description de la végétation sur les sites d'études et nombre de quadrats de démographie dans chaque milieu (le nombre d'individus en 2003 est indiqué entre parenthèses). Les essences sempervirentes sont soulignées.

changements d'utilisation des terres. La Pivoine officinale est inscrite en Annexe 2 sur la liste des espèces végétales protégées en France (arrêtés du 20/1/1982 et du 31/8/1995).

1.4.2. Les sites d'étude

Le choix des populations a été déterminé par des contraintes scientifiques et logistiques. Tout d'abord les contraintes liées à l'étude scientifique ont concerné les effectifs des populations et les milieux dans lesquels se trouvaient les populations. Dans le cadre de notre étude, une population devait comporter un nombre d'individus reproducteurs suffisant afin de mener à bien des expérimentations sur la biologie de la reproduction (cf. ci-après). Les autres sites d'étude ont été sélectionnés de manière à ce que chaque population comprenne suffisamment d'individus à la fois en milieu ouvert et en milieu fermé afin de pouvoir quantifier les impacts de la fermeture forestière sur le cycle de vie et de réaliser des suivis démographiques. Les contraintes logistiques ont concerné la proximité et l'accessibilité des sites et le nombre de populations pouvant être étudiées dans le cadre d'une thèse.

En tout, cinq sites ont donc été sélectionnés en Languedoc-Roussillon et Midi-Pyrénées (figure 1.4). Ils se trouvent sur des collines escarpées, au sol très caillouteux et drainant et présentent les caractéristiques physiques résumées dans la figure 1.4. Les effectifs de chaque population dans chaque milieu ont été estimés par extrapolation des effectifs recensés le long de transects (calculée à partir de la longueur et largeur (2-4 m) des transects) à la surface totale de la population (calculée à partir des cartes topographiques et de mesures faites sur le terrain). Les effectifs totaux estimés sur chacun des sites sont relativement importants (d'environ 2600 individus tous stades confondus au PSL à 11000 à STF), avec des densités faibles (0.06 à 0.98 individus par m² selon le site et le milieu). La majorité des individus des trois plus grandes populations se trouvent actuellement en milieu fermé (entre 74.5% et 81% des effectifs, mais 44% pour le PSL) (figure 1.5). Cependant, le nombre estimé d'individus reproducteurs est faible (d'environ 90 au PSL à 580 à STF, soit 3.4 et 5.3 % de l'effectif total, banque de graines exclue).

L'historique d'utilisation des terres est différent dans les quatre sites utilisés pour les suivis démographiques (tableau 1.5), mais tous sont aujourd'hui largement colonisés par des ligneux provenant de rejets de souches ou de plantations. Les essences sont soit sempervirentes (Chêne vert (*Quercus ilex* L.) au PSL et STF, Sapin Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Mirbel) à TAU), soit caducifoliées (Chêne Pubescent (*Q. humilis* Mill.) à VIS), (tableau 1.6). La matrice forestière n'est cependant pas homogène. Ainsi, des arbres caducifoliés isolés sont dispersés dans les taillis de Chêne Vert et la plantation de Sapin Douglass est entrecoupée de bandes de feuillus. Les zones ouvertes ont aussi des historiques différents et correspondent soit à des parties de taillis coupées (STF, TAU), soit à des zones de clairières en voie de colonisation par les ligneux (VIS, PSL).

Les caractéristiques écologiques dans chaque site ont été déterminées à partir de mesures faites dans les quadrats permanents de démographie de 2 x 2 m, placés uniquement dans des zones de présence de Pivoines (cf. protocole dans le chapitre démographie). Pour chaque quadrat, les

MESURES DE LUMIERE

La quantité de lumière atteignant les individus de Pivoines dans chaque site et milieu a été mesurée en 2003 et 2005. Sachant que les mesures sont faites à des heures et jours différents, un calcul du pourcentage de lumière à été calculé pour permettre de comparer les sites et les milieux. Pour ce la deux mesures ont été faites :

- La quantité de lumière (µmoles.m-2.s-1) a été mesurée dans chaque quadrat (moyenne de 4 mesures par quadrat) à l'aide d'un quantum linéaire placé à la hauteur du feuillage des Pivoines, et toujours orienté dans la même direction.

- La quantité de lumière atteignant le sol dans une zone parfaitement dégagée à été mesurée dans le même temps à l'aide d'un capteur ponctuel. Cette mesure sert donc de référence.

Le pourcentage de lumière atteignant les pivoines est le rapport de ces deux mesures. Les mesures ont été effectuées entre mi-juillet et mi-aout 2003 et 2005 entre 10h30 et 15h00. Le graphique ci-dessous montre les moyennes (± SE) de ces valeurs dans chaque site et milieu (à TAU, la zone de coupe correspond à une partie de la population en milieu fermé ayant subit une coupe en hiver 2003):

Site	Milieu	2003	2005	n
PSL	ouvert	0.57 ± 0.05	0.48 ± 0.05	18
	fermé	0.09 ± 0.02	0.25 ± 0.02	12
VIS	ouvert	0.36 ± 0.10	0.17 ± 0.05	9
	fermé	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.01	15
STF	ouvert	0.68 ± 0.06	0.58 ± 0.07	7
	fermé	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.02	12
TAU	ouvert	0.90 ± 0.07	0.60 ± 0.08	9
	fermé	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02	13
	zone de coupe	0.04 ± 0.01	0.49 ± 0.12	12

variables écologiques suivantes ont été mesurées : les % de recouvrement de terre nue (TN), mousse (M), litière (Liti), pierres d'une taille inférieure à 25 cm (PiInf), pierre d'une taille supérieure à 25 cm (PiSup), puis les % de recouvrement en herbacées (Herb), ligneux bas > 1m (LiBas), ligneux intermédiaires de 1-2 m (LiInt)et ligneux hauts >2m (LiHt) et l'espèce dominante de chacun des compartiments, et la hauteur du toit (Toit)de la végétation. Enfin, le % d'interception de la lumière (Lum) (ratio de l'intensité lumineuse mesurée sur le quadrat / intensité lumineuse dans une zone totalement dégagée, cf encadré). Ces mesures ont été faites en 2003 lors de la première année du suivi puis en 2005. Une ACP réalisée sur ces variables en 2003 met en évidence une plus grande similarité entre les milieux ouverts des quatre sites, et entre les milieux fermés des quatre sites, qu'entre les deux types de milieu pour chaque site (figure 1.6).

L'ajout des données de 2005 en individus supplémentaires permet de suivre l'évolution de la végétation de chaque quadrat dans chaque type de milieu dans chaque site (figure 1.7). On observe ainsi une stabilité de la végétation en milieu fermé (les nuages de points des quadrats en 2003 et des quadrats en 2005 se superposent), sauf au PSL, où le milieu semble s'ouvrir : ceci est du à la sévère attaque de chenilles du Bombyx disparate (*Porthetria dispar* L.), qui a provoqué une défoliation complète des Chênes de la région en 2005. En milieu ouvert, on observe une tendance à l'embroussaillement : le nuage de points des quadrats en 2005 se décale vers une augmentation des ligneux bas (< 1 m) et intermédiaires (1-2 m).

1.5 OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif global de cette thèse est de déterminer quels sont les mécanismes cruciaux dans la dynamique des populations des espèces végétales pérennes en milieu hétérogène et changeant. Plus précisément, de comprendre par quels mécanismes la fermeture forestière influence le fonctionnement des populations des espèces rares de milieu ouvert grâce à l'étude d'une espèce modèle : *Paeonia officinalis*.

Combiner l'étude de la dynamique des populations à celle des composantes du cycle de vie, de la biologie de la reproduction et de la génétique des populations permet d'atteindre les objectifs de la conservation d'une espèce (Schemske *et al.* 1994). Il n'est pas possible dans le cadre d'une thèse d'explorer toutes ces pistes. Il a donc été choisi de se focaliser sur l'étude de l'impact de la progression forestière sur la dynamique des populations et sur chaque composante du cycle de vie, couplée à l'étude du système de reproduction de cette espèce, cette dernière permettant d'acquérir de façon indirecte des indications sur la diversité et la structuration génétique des populations (Neel 2002). L'étude de la génétique des populations pourrait être une suite complémentaire à cette thèse (Lande 1988, Frankham 2005). Par ailleurs, une expérimentation de gestion d'une population a permis de compléter l'étude. Cette thèse a donc permis d'aborder trois grandes questions :

- (1) **Quel est l'impact de la fermeture forestière sur la dynamique des populations?** Des suivis démographiques ont été menés dans 4 populations comprenant une partie des individus en milieu ouvert et l'autre partie des individus en milieu fermé, et la dynamique des populations a

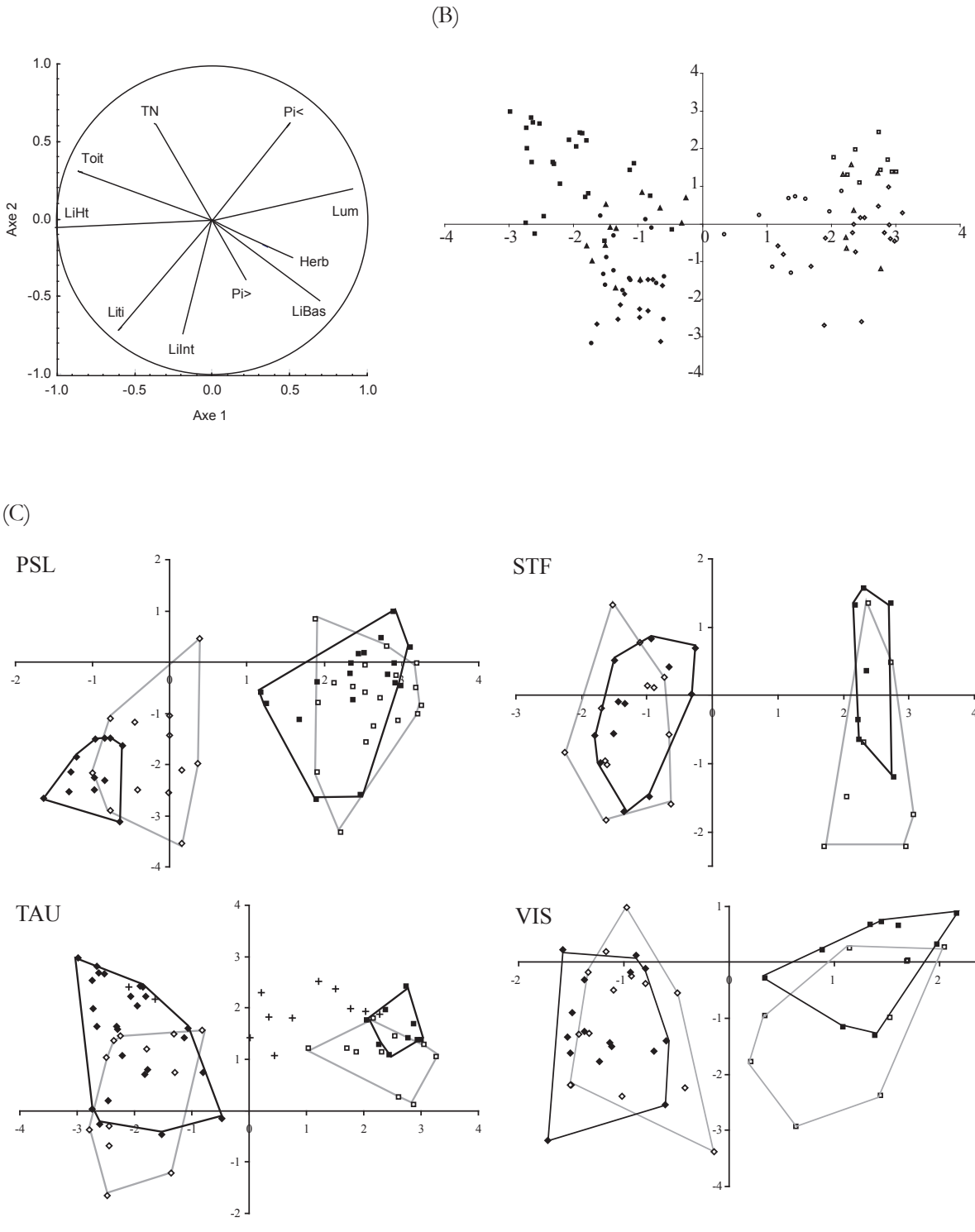


Figure 1.6. Résultats de l'ACP réalisée sur les variables écologiques mesurées dans chaque site en 2003, avec les données de 2005 en individus supplémentaires. (A) Cercle des corrélations (Axe horizontal = axe 1 : 37.8 % de variance ; axe vertical = axe 2 : 22.7 % de variance). (B) Quadrats de tous les sites (□ = TAU, ◇ = PSL, △ =STF, ○ = VIS)) et milieux (noir = milieu fermé, blanc = milieu ouvert) en 2003, (C) Quadrats par site : ◆ = milieu fermé 2003, ◇ = milieu fermé 2005, ■ = milieu ouvert 2003, □ = milieu ouvert 2005, + = zone coupée à TAU en hiver 2003 (valeurs en 2005).

été comparée entre les deux milieux. La gestion expérimentale a permis de quantifier l'impact de la réouverture du milieu sur un sous-échantillon d'une population localisée à l'origine en milieu fermé.

-(2) **Quel est l'impact de la fermeture forestière sur chaque composante du cycle de vie?** Dans une première partie, les conséquences de la fermeture forestière sur la biologie de la reproduction de la Pivoine officinale ont été quantifiées grâce à des études détaillées de son système de reproduction, de sa pollinisation et des allocations des ressources à la reproduction au sein d'une année (floraison, quantités absolue et relative de ressources allouées à la reproduction, et allocation différentielle des ressources entre fonction mâle et femelle) et sur plusieurs années (coût à la reproduction). La deuxième partie est focalisée sur les conséquences de la fermeture forestière sur les différentes formes de prédation : la prédation des graines non mûres, la prédation et la dissémination des graines mûres et la prédation des parties végétatives. La dernière partie concerne la régénération des plantules, et plus particulièrement la dormance des graines, la germination et l'établissement des plantules.

-(3) **Comment gérer les populations de Pivoines officinales et plus généralement les espèces pérennes de milieu ouvert menacées par la progression forestière?** Les perspectives pour la gestion de ces espèces ont pu être tirées à partir de l'étude de la dynamique des populations et du cycle de vie, et à partir de la modélisation d'un mode de gestion.

A partir de ces résultats, une réflexion sur l'approche utilisée dans la thèse a été menée, en particulier sur l'intérêt de combiner étude de la dynamique, étude du cycle de vie et expérimentation de gestion du milieu, ainsi que sur l'intérêt de prendre en compte les sources de variabilité. Enfin, l'importance de la niche de régénération vs. la niche de persistance chez les plantes pérennes longévives est discutée.

Partie II

Démographie et dynamique en milieu hétérogène

2.1 INTRODUCTION

Les modèles matriciels en tant qu'outils pour étudier la dynamique des populations ont été développés dans les années 1940, en particulier par Leslie puis par Lefkovitch dans les années 1960. L'utilisation de ces modèles est au début confinée à la biologie des populations animales, il faudra attendre les années 1970 pour que ces méthodes soient généralisées, en particulier en écologie végétale. Récemment, l'amélioration des performances des ordinateurs a facilité cet essor. Les modèles matriciels sont maintenant de plus en plus utilisés en biologie de la conservation (Oostermeijer *et al.* 2003) non seulement pour comprendre la dynamique des populations d'espèces rares, mais aussi pour proposer ou comparer différentes stratégies de gestion (Brys *et al.* 2004, Ehrlen *et al.* 2005, Menges *et al.* 2006).

Dans l'idéal, une étude de dynamique des populations devrait pouvoir prendre en compte les différentes stochasticités, i.e. les évènements aléatoires subis par les individus, auxquelles sont particulièrement sensibles les petites populations : a) la stochasticité environnementale (variations biotiques ou abiotiques du milieu, comme par exemple les variations d'abondance des pollinisateurs ou celles des conditions climatiques), b) la stochasticité démographique (liée au fait que la survie, la croissance et la fécondité des individus sont des évènements aléatoires dont la réalisation dépend de la taille des populations) et c) la stochasticité génétique (liée au tirage aléatoire des gènes présents dans la population d'une génération à l'autre).

La prise en compte de la variabilité temporelle des paramètres démographiques est particulièrement importante pour comprendre la dynamique des espèces ayant des banques de graines et des espèces pérennes à longue durée de vie. En effet, les taux de croissance des populations peuvent présenter de fortes variations inter-annuelles (Horvitz et Schemske 1995), et un recrutement épisodique peut suffire à maintenir une population viable (Menges et Dolan 1998). Alors que le suivi des individus doit être donc mené sur une période longue afin de capturer toute cette variabilité (Lindborg et Ehrlen 2002), la majorité des études de démographie d'espèces pérennes est basée sur des suivis de moins de 5 ans (Menges 2000). Les paramètres démographiques peuvent aussi présenter une forte variabilité spatiale (Horvitz et Schemske 1995, Oostermeijer *et al.* 1996) : si la prise en compte de la variabilité spatiale est relativement répandue, ces études ne prennent en compte qu'un nombre réduit de populations (médiane : 2 populations (Menges 2000)). Enfin, si le but de l'étude est d'estimer la probabilité d'extinction des populations, les modèles prenant en compte les stochasticités environnementales et temporelles donnent des informations utiles (Fieberg et Ellner 2001) mais leur pouvoir prédictif peut être limité (Lindborg et Ehrlen 2002). Pour estimer la viabilité des populations (analyses de viabilité des populations, PVA), le maximum de connaissances sur le fonctionnement des populations est nécessaire afin d'obtenir les prédictions les plus fiables possibles (Menges 2000, 2000, Reed *et al.* 2002), et les modèles doivent aussi prendre en compte les risques liés aux évènements catastrophiques (Mangel et Tier 1994), les caractéristiques génétiques (Reed et Frankham 2003), la structuration spatiale de l'habitat et la

MODELES MATRICIELS

1– Les modèles sont structurés : la formule générale de ces modèles est $\boldsymbol{n(t+1)=A.n(t)}$, *n(t)* étant le vecteur des abondances dans chaque classe d'individus au temps *t* et *A* étant la matrice de projection composée des probabilités de transition des individus d'un stade à un autre. Ces modèles nécessitent donc l'utilisation de classes d'individus, au sein desquelles on fait l'hypothèse que tous les individus sont identiques, c'est-à-dire qu'ils ont les mêmes probabilités de transition (pas de variance environnementale ou génétique) (Caswell 1972). Il faut donc choisir un descriptif en conséquence, classiquement l'âge des individus ou la taille des individus.

Chez les plantes herbacées pérennes, l'âge est difficile à estimer car il n'est pas corrélé à la taille des individus et il n'y a pas de cernes de croissance dans les tiges. Chez les géophytes, des techniques d'estimation de l'âge à partir des cernes de croissance des organes de réserves est possible (Dietz et Ullmann 1997), mais cette méthode étant destructive, elle ne peut être réalisée dans le cadre d'un suivi individuel. Chez les plantes le meilleur descriptif n'est souvent pas l'âge des individus mais leur taille ou leur stade développemental. Ainsi, l'évènement de reproduction, la fécondité et la mortalité sont souvent plus dépendants de la taille ou de la biomasse des individus que de leur âge (Harper 1977, Caswell 2001), rendant plus appropriée l'utilisation de classes de taille ou de stades définies par exemple à partir de la morphologie des individus ((Rabotnov 1969, Gatsuk *et al.* 1980). Les modèles basés sur les classes de taille ou sur les stades sont appelés modèles de Lefkovitch. Six stades ont été définis pour étudier la démographie des Pivoines officinales, à la fois basés sur le stade de développement, la morphologie et la taille des individus.

2 – les modèles utilisés sont des chaînes de Markov d'ordre 1 : ils sont discrets dans le temps et l'état des individus au temps *t+1* ne dépend que de celui au temps *t* et non de celui à *t-1* ou *t-2,* etc.

3 – les modèles utilisés sont des modèle linéaires (i.e. *A* ne varie pas en fonction du vecteur *n*, contrairement aux cas de densité-dépendance par exemple) ***et constants dans le temps*** (i.e. *A* ne varie pas en fonction de vecteurs indépendants de la population, comme par exemple les conditions climatiques). La matrice de transition *A* est donc constante. Ce choix résulte du fait que, avec seulement trois années de suivi et donc deux matrices de transition, il n'a pas semblé opportun de faire des modèles prenant en compte la stochasticité environnementale, en particulier pour une espèce pouvant vivre plusieurs dizaines d'années, et au début de la mise en place d'un suivi à long terme. Les modèles stochastiques seront développés ultérieurement. Les modèles déterministes ne sont pas prédictifs, mais ils permettent d'acquérir des informations précieuses sur le statut présent des populations et de comparer des populations entre elles.

dissémination (Kindvall 2000).

Les suivis individuels permettent d'acquérir des informations précieuses pour la gestion des populations, mais ils sont très contraignants en temps et en investissement, et ne peuvent donc pas être utilisés de façon généralisée ou en routine par les gestionnaires. Une alternative est l'étude de la structure démographique des populations, c'est-à-dire de la proportion des individus dans chaque stade démographique, que l'on peut obtenir en faisant de simples recensements des individus sur des transects. La structure démographique peut donner des indications sur la dynamique des populations : on peut définir des populations de type "actif" (beaucoup de reproducteurs et de recrutement) et des populations "sénescentes" (proportion importante d'adultes végétatifs, peu de recrutement) (Oostermeijer *et al.* 1994). Cependant, cette interprétation demande beaucoup de prudence. Plusieurs études ont montré une relation au sein d'une espèce entre la structure démographique et la qualité ou la structure de l'habitat (Oostermeijer *et al.* 1994, Garcia *et al.* 1999, Bruna et Kress 2002, Garrido *et al.* 2003, Tomimatsu et Ohara 2004), ou la fécondité (Brys *et al.* 2003), ce qui suggère que l'utilisation de cette méthode de façon comparative (populations au sein d'une espèce) est assez robuste. Cette méthode permet donc aussi de comparer différentes actions de gestion (Buhler et Schmid 2001, Hegland *et al.* 2001) ou l'impact de prélèvements sur les populations (Van der Voort *et al.* 2003). Par ailleurs, l'analyse de la dynamique des populations à partir de relevés successifs de la structure démographique est possible (Caswell 2001) : l'intérêt pour le suivi des populations par les gestionnaires est évidente, cependant cette méthode ne semble pas être employée en dynamique des populations végétales.

L'étude réalisée dans le cadre de cette thèse est courte (3 années de suivi) et il est donc nécessaire de rester réaliste et prudent avec les analyses et les conclusions, mais elle constitue le point de départ d'une étude à long terme. Son objectif est de quantifier les impacts de la fermeture forestière sur la dynamique des populations et donc de relier la dynamique aux changements des conditions environnementales.

2.2 MÉTHODOLOGIE

Utilisation de modèles matriciels – Les modèles démographiques matriciels permettent de lier les devenirs individuels - i.e. les passages de chaque individu d'une étape du cycle de vie à l'autre – à la structure démographique et la dynamique des populations – i.e. les probabilités de germination, d'établissement, de croissance, de survie et de reproduction au niveau de la population. Les modèles matriciels utilisés ici reposent sur trois hypothèses, détaillées dans l'encadré "Modèles matriciels" : ces modèles sont structurés en stades, sont des chaines de Markov d'ordre 1, et sont linéaires et constants dans le temps.

Quadrats et placettes de démographie – Dans chaque population et chaque milieu, des quadrats permanents (2 x 2 m) ont été disposés en 2003 uniquement dans des zones de présence de Pivoine (tableau 1.6). Au sein de ces zones, les quadrats ont été disposés sans chercher à choisir

DESCRIPTION DES STADES

Six stades ont été décrits pour étudier la démographie des Pivoines officinales :

- le stade **Banque de Graines** (**BG**) correspond aux graines ne germant que le deuxième printemps après leur production (soit presque 2 ans).

- la morphologie des jeunes individus ne permet pas de différencier avec certitude les individus ayant germé le printemps même et donc ayant moins d'un an au moment des relevés, et les individus ayant germé 1 ou 2 années plus tôt. Le stade Plantule (**P)** correspond donc à un mélange de ces individus, reconnaissables au fait qu'ils n'ont qu'une seule feuille à trois folioles, celles-ci n'étant pas ou faiblement divisées (i.e. la division n'atteint pas la nervure principale de la foliole).

- le stade **Végétatif 1** (**V1**) correspond à des individus n'ayant pas de tige mais une seule feuille, dont les trois follioles principales sont profondément divisées.

- le stade **Végétatif 2** (**V2**) correspond à des individus ayant une tige portant deux feuilles ou plus.

- le stade **Avorté** (**A**) correspond à des individus morphologiquement semblables à ceux du stade V2 mais ont un bouton floral ayant avorté.

- les individus **Reproducteurs** (**R**) sont morphologiquement proches des individus du stade V2 mais ont produit au moins une fleur.

Le détail des caractéristiques des individus de chaque stade est en annexe XXX. Le tableau suivant résume les caractéristiques de ces stades (sont données les valeurs maximales et minimales des moyennes par sites et par milieux).

systématiquement les zones les plus denses en individus, afin de ne pas biaiser l'échantillonnage vers les zones les plus dynamiques. Les quadrats ont été marqués à proximité immédiate de l'un de leurs angles à l'aide d'une étiquette métallique numérotée clouée dans le tronc d'un ligneux ou dans un rocher, les trois autres angles étant matérialisés par des sardines métalliques plantées dans le sol.

Tous les individus dans les quadrats ont été identifiés et cartographiés. Les paramètres suivants ont été recueillis sur chaque plante : a) le stade morphologique (cf. l'encadré "Description des stades "), b) la taille (nombre de tiges, nombre de feuilles par tige, longueur et largeur de la plus grande feuille de chaque tige) et c) le pourcentage de prédation de chaque tige ont été relevés en Juin ; puis d) les paramètres concernant la reproduction (nombre de fleurs, nombre de graines et d'ovules de chaque individu reproducteur) ont été recueillis en Juillet, juste avant la déhiscence des follicules. Lors de la deuxième année de suivi en 2004, nous nous sommes rendus compte que la localisation précise des tiges d'un même individu pouvait varier d'une dizaine de centimètres d'une année sur l'autre (ceci étant dû au fait que les tiges repoussent intégralement chaque printemps et que le sol est très caillouteux) ce qui posait des problèmes d'identification dans les zones particulièrement denses. Lorsque la densité des individus était trop importante dans une partie d'un quadrat, celle-ci a été exclue (ce quadrat fait donc moins de 4 m^2) c'est-à-dire que les individus dans cette zone n'ont pas été suivis alors que ceux situés dans le reste du quadrat ont été conservés. Ces quadrats ($n < 5$) seront éliminés du suivi à partir de 2006 afin de faciliter le suivi sur le long terme.

Des semis ont été réalisés dans chaque site et chaque habitat dans le but (1) de comparer les taux de germination entre milieu ouvert et sous-bois et (2) d'acquérir des informations supplémentaires sur le cycle de vie en complément des suivis démographiques. En Juillet 2003, 352 graines ont été collectées dans chaque site (VIS, SFL et TAU) à l'exception du PSL où seulement 172 graines ont été récoltées à cause du petit nombre d'individus reproducteurs. En août 2003, les placettes de semis ont été installées à proximité des quadrats de démographie, chacune étant constituée de deux quadrats adjacents de 40 x 40 cm de côté et distants de 15-25 cm. Dans l'un des quadrats, les graines ont été plantées à moins de 5 cm de profondeur et de façon régulière de manière à pouvoir identifier chaque individu. Enterrer les graines est le seul moyen d'éviter qu'elles ne soient déplacées hors des placettes par le ruissellement dans les sites d'étude qui ont une forte pente. Ce protocole peut avoir comme conséquence de surestimer le taux de germination car les graines enterrées sont moins détectables par les prédateurs que lorsqu'elles sont en surface. Aucune graine n'a été plantée dans le deuxième quadrat, celui-ci permettant de contrôler l'arrivée éventuelle de graines par dissémination ou la germination à partir d'une hypothétique banque de graines.

Chaque placettes a été disposée à 2-5 m d'un quadrat démographique : cette distance à été choisie pour que les placettes soient suffisamment proches pour leurs conditions écologiques soient similaires à celles dans le quadrat, et suffisamment éloignées pour que ces plantations ne puissent interférer avec la dynamique dans les quadrats (densité-dépendance). De plus, ces placettes sont situées à au moins 2 m de l'individu reproducteur le plus proche (dans ou hors quadrat de démographie) afin d'éviter un apport extérieur de graines trop important. Six placettes de germinations ont ainsi été disposées dans chaque milieu à VIS, SFL et TAU (cinq placettes

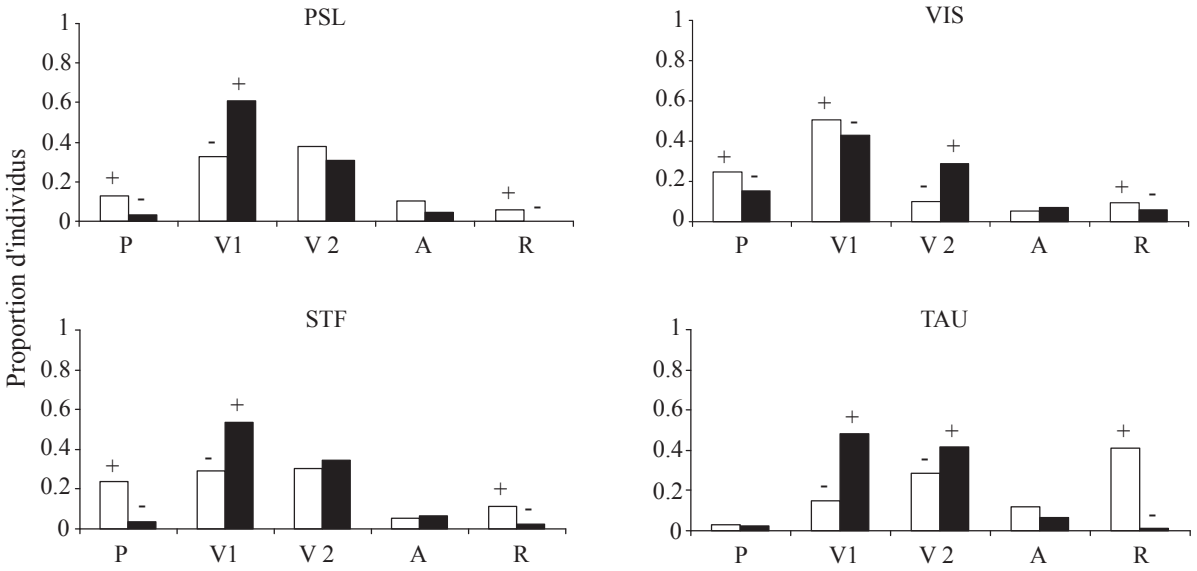


Figure 2.1. Les structures démographiques en milieu ouvert (blanc) et fermé (noir) diffèrent significativement dans les quatre populations (PSL : $\chi^2 4 = 30.06$, $p < 0.001$; VISS : $\chi^2 4 = 50.71$, $p < 0.001$; STF : $\chi^2 4 = 108.49$, $p < 0.001$; TAU : $\chi^2 4 = 53.23$, $p < 0.001$). Les résultats des tests d'Habermann sont codés (+) si la fréquence observée est significativement supérieure à la fréquence théorique et (-) si elle est significativement inférieure. La proportion de Reproducteurs et de Plantules est plus faible en milieu fermé dans les quatre sites (sauf à TAU où le nombre de plantules est particulièrement faible). La proportion des V2 est soit identique soit plus importante en milieu fermé, et celle des stades végétatifs V1 est plus importante en milieu fermé à TAU, PSL et SFL mais plus importante en milieu ouvert à VIS.

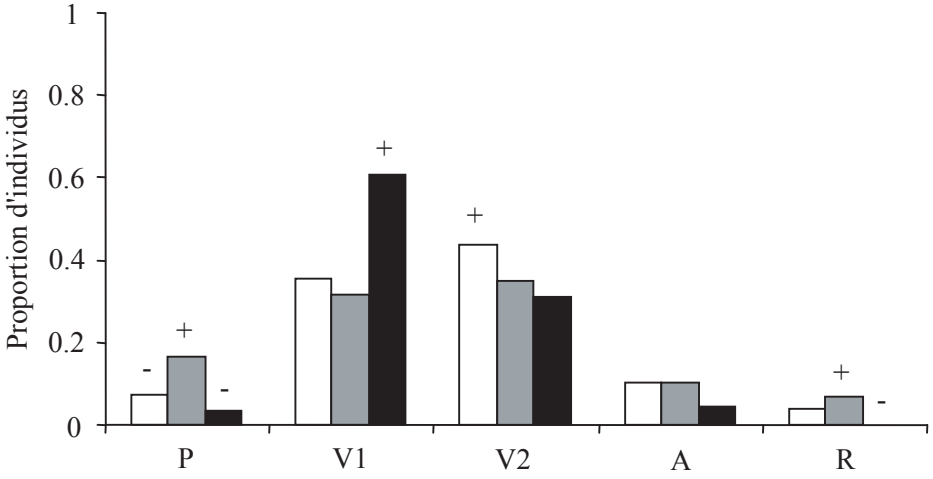


Figure 2.2. Proportion d'individus dans chaque stade en milieu ouvert (blanc), lisière (gris) et milieu fermé (noir) au PSL en 2002. Les résultats des test d'Habermann sont codés (+) si la fréquence observée est significativement supérieure à la fréquence théorique et (-) si elle est significativement inférieure. Les structures démographiques diffèrent significativement entre les trois types de milieu ($\chi^2 8 = 42.61$, $p < 0.001$). Au niveau de la lisière, on observe une sur-représentation des reproducteurs et des plantules et une sous-représentation des végétatifs (V1).

avec 30 graines et une avec 26 graines, soit 352 graines par site) alors qu'au PSL, seulement trois placettes ont été disposées dans chaque milieu (deux placettes de 30 graines et une de 26, soit 172 graines dans ce site).

Structure démographique et taille des populations – Afin de comparer les structures démographiques entre les milieux ouvert et fermé, des recensements ont été effectués le long de transects parcourant les populations dans chaque type d'habitat. Ces recensements ont eu lieu en 2002 à PSL et 2005 pour les autres sites d'étude, et ont concerné 1115 individus à VIS, 701 à SFLO, 205 à TAU et 576 au PSL. Au PSL, un transect a aussi été réalisé en lisière.

2.3 SUIVI DES POPULATIONS

Cette partie est consacrée à la comparaison de la démographie des Pivoines en milieu ouvert et fermé. L'impact de la fermeture forestière a été quantifiée au sein de populations comprenant une partie de leurs individus en milieu ouvert et l'autre en milieu fermé. La comparaison de la structure démographique et de la dynamique entre les deux types de milieux a permis de mettre en évidence les parties du cycle démographique affectées par la fermeture forestière et les stades sur lesquels une action de gestion serait la plus efficace. Le chapitre 2.3.1 est consacré à l'étude de la structure démographique actuelle des populations, i.e. l'étude de la répartition des effectifs dans chaque stade à partir de relevés effectués le long de transects établis dans les populations. Ensuite, le chapitre 2.3.2 présente une étude détaillée de la dynamique des populations, basée sur des suivis individuels dans les quadrats démographiques et les placettes de semis.

2.3.1 Structure démographique des populations

Dans chaque site et chaque type de milieu, les effectifs d'individus de chaque stade (à l'exception de la banque de graines) recensés sur les transects ont été comparés grâce à des tests de χ^2, suivis de tests de Habermann afin de détecter les effectifs responsables de la significativité du test. Une analyse plus fine, réalisée en 2002 au PSL, a consisté à comparer les structures démographiques en milieu ouvert, fermé et aussi en lisière (cf. article annexe 2.1).

Les structures démographiques suggèrent des fonctionnements des populations qui diffèrent entre milieux, puisqu'en milieu fermé il y a moins d'individus reproducteurs et de plantules et plus d'individus végétatifs qu'en milieu ouvert (figure 2.1). L'origine des individus de stade V1 est multiple : on pourrait penser que ces individus proviennent directement du stade P (progression), mais le fait que l'on ait plus d'individus de stade V1 en milieu fermé qu'en milieu ouvert alors qu'il y a moins d'individus au stade P suggère qu'une partie des V1 a une origine autre, i.e. des individus restants dans ce stade (stase) ou des individus de stades plus avancés ayant régressés au stade V1 (régression). Au site du PSL, qui se trouve isolé à la périphérie de l'aire de distribution de l'espèce (figure 1.4), les lisières semblent jouer un rôle important dans le fonctionnement de la population

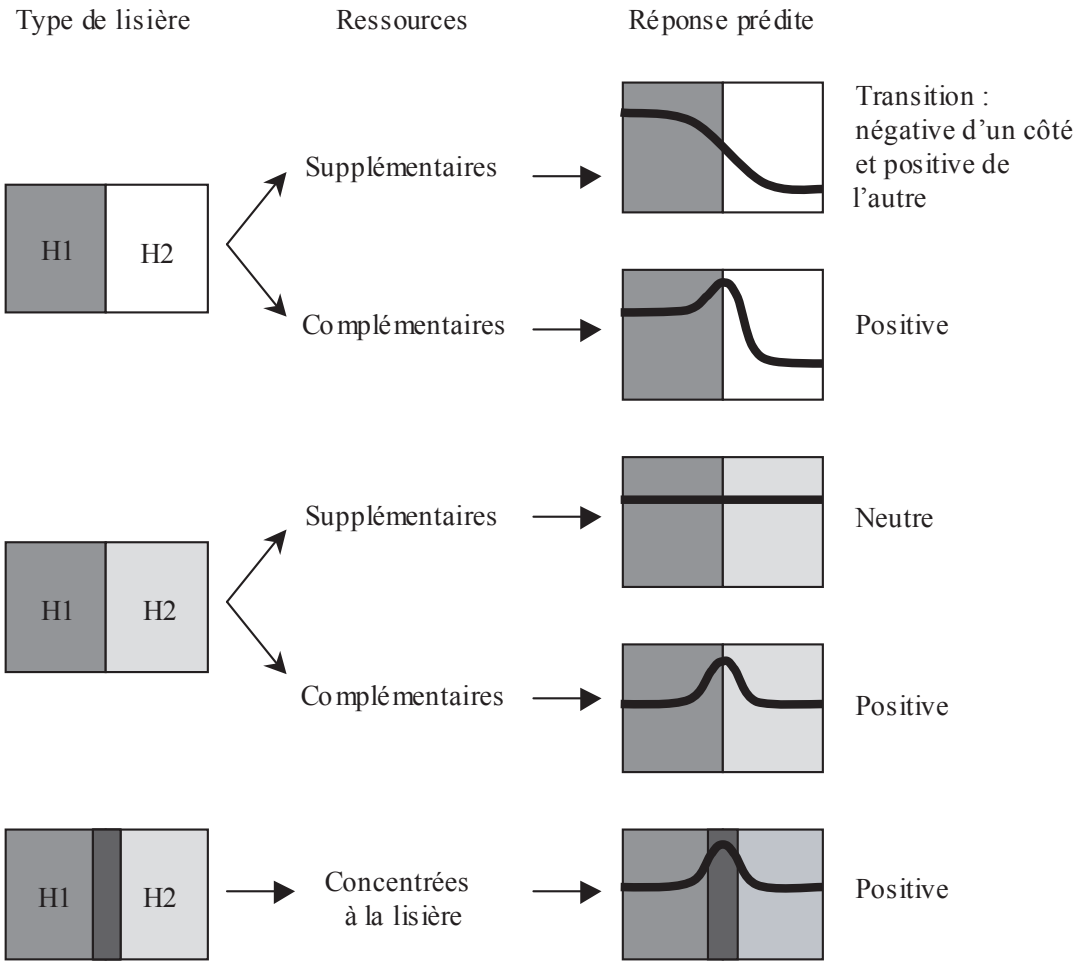


Figure 2.3. Différents types de réponses attendues au niveau de la lisière entre deux types d'habitat différant par leur favorabilité (d'après Ries *et al* 04). Ce modèle met en évidence qu'une même espèce peut présenter des réponses aux lisières négatives, neutres ou positives selon le type de lisière. H1 : habitat favorable dans lequel se trouve une partie des ressources, H2 habitat moins favorable c'est à dire soit (1) ne possède pas la ressource ou est de faible qualité, (2) est favorable mais ne possède pas les même ressources et (3) est favorable mais ne possède pas les même ressources et la lisière est le lieu où les ressources sont concentrées. Les ressources peuvent être complémentaires ou supplémentaires.

(figure 2.2). En effet, on observe sur la lisière une sur-représentation des reproducteurs et des plantules et une sous-représentation des individus végétatifs (V1) par rapport au milieu fermé et au milieu ouvert. Par ailleurs, la densité des individus en lisière est 2,4 fois plus importante qu'en milieu ouvert et 3,3 fois plus importante qu'en milieu fermé, ce qui correspond à un meilleur recrutement si les individus reproducteurs en milieu ouvert produisent pas moins de graines que les individus en lisière (ce qui est vraisemblable aux vues des relations entre production de graines et fermeture du milieu, cf. chapitre 3.1).

La structure démographique suggère des différences de fonctionnement des populations entre milieux. En milieu fermé, les individus semblent rester à l'état végétatif sous forme de stade V2 mais aussi de V1, ce qui induit un recrutement plus faible. Les différences de structure démographique entre milieux pourraient refléter une plus faible acquisition des ressources en milieu fermé, dûe à la réduction de l'intensité lumineuse (par rapport à l'intensité lumineuse maximale, il y a une réduction de 10,0 - 64,0 % de la lumière incidente en milieu ouvert contre 90,6 - 96,0 % en milieu fermé en moyenne par milieu dans chaque site) ou à une réduction de la disponibilité en eau ou en nutriments. L'évènement de floraison étant taille-dépendant chez beaucoup de plantes pérennes comme la Pivoine officinale (voir chapitre 3.1.4), la limitation en ressources pourrait donc être le mécanisme limitant la floraison.

Les lisières constituent une zone de transition entre le milieu ouvert et le milieu fermé : leurs caractéristiques physico-chimiques sont donc intermédiaires (Matlack 1993, Cadenasso *et al.* 1997). Une espèce donnée peut réagir de différentes façons aux lisières, en fonction de la qualité des habitats de part et d'autre de celle-ci (par exemple un des deux habitats peut être de qualité moindre) et des types de ressources présentes dans les deux milieux (elles peuvent être complémentaires ou supplémentaires) (figure 2.3) (Ries *et al.* 2004, Ries et Sisk 2004). Dans le cas de la Pivoine officinale sur le site du PSL, il semble que l'on se trouve dans le cas d'une réponse positive entre deux habitats différant par leur favorabilité et dont les ressources sont complémentaires, ie probablement ici la luminosité et la disponibilité en eau. Les lisières semblent ici réunir des conditions plus favorables pour le fonctionnement de la population qu'en milieu ouvert ou fermé, puisqu'on y observe plus de reproduction et de recrutement. Dans ce site, le milieu ouvert ne correspond pas à une coupe du taillis mais à une clairière naturelle, où la roche mère affleure, difficilement colonisée par les ligneux hauts depuis l'arrêt des coupes du taillis (figure 1.2) : ce milieu pourrait donc être défavorable sur ce site à cause de sa faible disponibilité en eau et nutriments, pouvant causer la mortalité des plantules et limiter l'acquisition des ressources des adultes.

2.3.2 Dynamique des populations

2.3.2.1 Méthodologie

Déterminer le rôle exact de la fermeture forestière sur la démographie de ces populations nécessite d'analyser leur dynamique. A partir des suivis individuels dans les quadrats et les placettes de semis, les matrices de transition A ont été construites pour les transitions 2003-2004 et 2004-2005 pour chaque milieu dans chaque population. Ces matrices sont constituées des probabilités de transition

PROBABILITES DE TRANSITION

calculs à partir des placettes de semis

soient : G le nombre moyen de graines produites par individu
M le nombre de graines n'ayant pas germées au bout de 2 ans

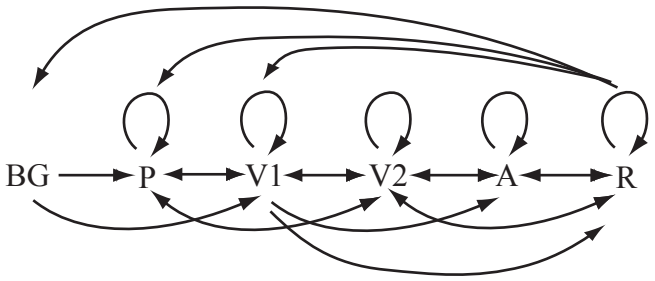
Sous l'hypothèse qu'une graine n'ayant pas germé au bout de 2 ans est morte
Sous l'hypothèse que la probabilité $(1-s_0)$ de ne pas survivre pour une graine la 1ère ou la 2ème année est la même.

Calcul à partir du suivi des placettes au bout d'un an :
R –>P = $G.a$ avec a = nombre de P produites la 1ère année / nombre de graines semées
R –>V1 = $G.b$ avec b = nombre de V1 produits la 1ère année / nombre de graines semées
R –> mort = $G.(1-s_0)$ avec $(1-s_0)$, la probabilité de mortalité des graines
R –> BG = $G.g = G.(1-a-b-(1-s_0))$ avec g, la probabilité qu'une graine entre dans la banque
a et b étant connus, il reste à déterminer g et m.

Calcul à partir du suivi des placettes au bout de deux ans :
BG –> P = d = nombre de P produites la 2ème année / (nombre de graines semées*g)
BG –> V1 = c = nombre de V1 produits la 2ème année / (nombre de graines semées*g)
BG –> mort = $(1-s_0)$, (hypothèse du modèle)
M = nombre de graines mortes la 1ère année + nombre de graines mortes dans la banque la 2ème année
avec $M = G((1-s_0)+g.(1-s_0))$ or $g = 1-a-b-(1-s_0)$
$(1-s_0)$est donc une solution de l'équation du second degré :
$-G.(1-s_0)^2+G.(1-s_0).(2-a-b)-M=0$
Connaissant a, b, $(1-s_0)$, on en déduit alors g et donc l'ensemble des probabilités de transition et paramètres démographiques.

a_{ij} des individus étant dans le stade *j* au temps *t* (colonnes) qui sont dans le stade *i* au temps *t*+1 (lignes). Les probabilités de transition entre les stades et le nombre moyen de graines produites par les reproducteurs ont été estimés à partir des suivis individuels dans les quadrats. Les probabilités de germination l'année suivant la production des graines et après passage dans la banque de graines ont été calculées à partir des taux de germinations observés dans les placettes de semis expérimentales. Nous avons fait deux hypothèses : (1) une graine ne peut rester plus de deux ans dans la banque de graines (cette hypothèse ne pourra être vérifiée qu'à l'issue du suivi des placettes de semis en 2006), et (2) la probabilité de survie d'une graine faisant partie du pool de graines pouvant germer dès la première année est la même que celle d'une graine dans la banque de graines (s_0). L'encadré "Probabilités de transition" donne les détails des calculs de probabilités de transition qui font intervenir les données des placettes de semis. Toutes les analyses ont été effectuées sur les matrices de transition moyennes, correspondant à la pondération par les effectifs des valeurs des matrices des deux couples d'années.

Les paramètres démographiques apparaissant dans les matrices de transition et le cycle démographique sont détaillés dans l'encadré "Paramètres démographiques". Le détail des valeurs des probabilités de transition et des paramètres démographiques pour chaque site et milieu se trouve en Annexe 1. Le cycle démographique de la Pivoine officinale est donc le suivant :



L'analyse de la démographie s'est faite en trois parties. En ce qui concerne la dynamique des populations, nous avons travaillé en faisant l'hypothèse que les conditions environnementales présentes étaient maintenues telles quelles sur le long terme (modèle déterministe). Nous avons étudié la dynamique asymptotique (i.e. le comportement des populations à l'équilibre), la dynamique transitoire (i.e. la dynamique des populations avant qu'elles aient atteint l'équilibre) et l'effet des perturbations (i.e. la réponse du taux d'accroissement asymptotique à des variations des paramètres de A par des analyses d'élasticité). Puis plusieurs paramètres liés aux fonctions de survie et de fécondité ont été calculés. Enfin, les dynamiques des parties des populations en milieu ouvert et en milieu fermé ont été comparées grâce au Δ de Keyfitz pour comparer les distributions en stades, par des tests de randomisation pour comparer les taux d'accroissement asymptotique et des analyses de réponse des paramètres démographiques pour identifier les paramètres démographiques responsables des différences de dynamique entre habitats (LTRE). Le détail de ces analyses est donné dans l'encadré "Détail des analyses" (ci après). L'intervalle de projection choisi est de un an. Tous les calculs ont été réalisés avec Matlab.

DETAIL DES ANALYSES DEMOGRAPHIQUES

L'analyse de la dynamique de l'espèce étudiée a été faite en trois grandes parties.

A : étude de la dynamique des populations

Ont été etudiés pour chaque matrice (i.e. dans chaque type de milieu dans chaque site) :

- (1) **la dynamique asymptotique,** i.e. le comportement de la population à long terme une fois l'équilibre atteint, avec :

- le taux de croissance asymptotique de la population (λ), qui correspond à la plus grande valeur propre de *A*. Dans un modèle déterministe, la valeur de λ par rapport à 1 indique si la population est stable (λ = 1), croît (λ > 1) ou décroît (λ < 1) à long terme. Afin de déterminer si les λ étaient significativement différents de 1, des méthodes de rééchantillonnage (bootstraps) ont été utilisées dans chaque milieu de chaque population de la manière suivante : les individus et la succession des stades qu'ils ont occupé pendant la période de suivi, ainsi que le nombre de graines produites pour les individus reproducteurs ont été tirés aléatoirement avec remise au sein de chaque quadrat et chaque placette de germination (n = 2000 bootstraps) afin de suivre au plus près le protocole d'échantillonnage (Caswell 2001). A chaque fois, la matrice *A* puis λ ont été calculés, permettant en définitive de connaître la distribution en fréquence des λ. Si la valeur 1 est comprise dans les 2.5-97.5 centiles de la distribution en fréquence des λ , alors l'hypothèse H_0 : λ = 1 n'est pas rejetée au risque α = 5 %. Pour la population du PSL en milieu fermé, le faible nombre de reproducteurs conduit, par les hasards de l'échantillonnage, à des matrices particulières où une partie des individus finissent reproducteurs avec une probabilité de 1 de rester dans cette classe : ces matrices biologiquement impossibles (immortalité) ont été éliminées.

- la distribution stable en stades (DSS) qui correspond au vecteur propre à droite de la matrice *A* associé à λ. Ce vecteur donne les proportions d'individus de chaque stade morphologique une fois le régime stationnaire atteint.

- les valeurs reproductives (VR) obtenues à partir du vecteur propre à gauche de *A* associé à λ. Ce vecteur représente la participation à la reproduction des individus de chaque stade morphologique en prenant en compte leur trajet dans le cycle de vie.

- (2) **la dynamique transitoire**, i.e. la dynamique des populations avant que l'équilibre soit atteint. Le "*damping ratio*", décrivant le caractère oscillatoire des effectifs avant d'atteindre la DSS, est obtenu en faisant le rapport de la première et deuxième valeur propre de *A* : ϱ = λ1/|λ2|.

- (3) **l'effet des perturbations,** i.e. la réponse du taux d'accroissement asymptotique à des variations des paramètres de démographie ou des éléments de *A*. Les analyses d'élasticité sont des analyses prospectives, dans le sens où elles permettent de savoir quelles variations de λ pourraient être induites par une variation d'un paramètre démographique ou d'un élément de *A*. Elles traduisent la dépendance fonctionnelle entre λ et les paramètres démographiques, indépendamment des variations passées, actuelles ou futures de λ (Caswell 2000). Ces analyses sont précieuses en biologie de la conservation car elles permettent d'identifier les stades ou paramètres sur lesquels une action de conservation serait la plus efficace, i.e. augmenterait le plus λ (de Kroon *et al.* 2000). Les élasticités de λ aux éléments a_{ij} de la matrice de transition ont été calculées de la façon suivante :

$$e(a_{ij}) = \frac{\partial \log \lambda}{\partial \log a_{ij}} = \frac{\partial \lambda / \lambda}{\partial a_{ij} / a_{ij}}$$

La somme de toutes les élasticités aux éléments de la matrice étant égale à 1, elles peuvent aussi être interprétées comme des contributions à λ (voir Annexe 1). Les élasticités de λ aux paramètres démographiques (lower level parameters) ont été calculées de la façon suivante :

$$e(x) = \frac{x}{\lambda} \times \frac{\partial \lambda}{\partial x} = \frac{x}{\lambda} \sum_{i,j} \frac{\partial \lambda}{\partial a_{ij}} \times \frac{\partial a_{ij}}{\partial x}$$

avec e(x) l'élasticité de de λ au paramètre démographique x, i.e. aux f_{ij} pour les fécondités, s_i pour les survies, c_{ij} pour les croissances et d_{ij} pour les régressions (cf. matrice). Les élasticités du taux d'accroissement asymptotique λ aux paramètres démographiques renseignent sur l'impact de leur variation sur la valeur de λ. Le détail des élasticités de λ à chaque paramètre se trouve en Annexe 1. Une élasticité globale a été calculée pour la fécondité, la croissance et la régression (somme des élasticités des f_{ij}, c_{ij} et d_{ij}, respectivement). La somme des élasticités aux survies étant toujours égale à 1 (car ces paramètres apparaissent systématiquement dans chaque élément de la matrice), les paramètres de survie ont été considérés un par un.

B : paramètres liés aux fonctions de survie et de fécondité (Caswell 2001)

-(1) le **temps passé en moyenne dans chaque stade** i par un individu j durant sa vie (correspondant aux éléments de la matrice dite fondamentale *N*, telle que $N \equiv (I-T)^{-1}$, avec *I* la matrice identité et *T* la matrice contenant toutes les transitions sauf celles liées à la fécondité) et l'**espérance de vie** (temps avant la mort par stade, soit la somme des éléments de *N* par colonne).

-(2) la **distribution stable en âge au sein des stades** : une fois le régime stationnaire atteint, les individus dans le stade *j* ont eu des histoires différentes, c'est-à-dire qu'ils peuvent provenir de différentes boucles dans le cycle de vie, et donc peuvent avoir différents âges.

-(3) le **taux de reproduction net** R_0 correspondant au nombre moyen de descendants par lesquels un individu sera remplacé à la fin de sa vie (valeur propre dominante de la matrice *R* telle que *R=F.N, F* étant la matrice contenant les transitions liées aux fécondités).

-(4) le **temps de génération**, caractérise le turn-over des individus, mesuré ici de deux manières différentes : T_g correspond au temps mis par la population pour multiplier ses effectifs d'un facteur R_0 ($T_g = \log R_0 / \log \lambda$), et *T* à l'inverse de la somme des élasticités de λ aux fécondités (Lebreton 2005).

C : comparaison des dynamiques en milieu ouvert et en milieu fermé

-(1) Les différences de taux d'accroissement des populations entre les milieux ont été testées par **randomisation**, en faisant l'hypothèse H_0 que si le devenir des individus est indépendant du milieu dans lequel ils se trouvent, il n'y a pas de différence de taux d'accroissement entre les types de milieu, c'est-à-dire $\theta = |\lambda_{ouvert} - \lambda_{fermé}| = 0$. Pour tester cette hypothèse, pour chaque population, les individus et leur histoire ont été permutés aléatoirement entre milieu fermé et ouvert, séparément

pour les données issues des quadrats et celles issues des placettes de semis, afin d'obtenir 2000 estimations $\theta^{(i)}$ (i = 1, …, 2000) de θ. La probabilité que $\theta_{observé} \geq \theta$ sous H_0 est calculée de la façon suivante :

$$P[\theta \geq \theta_{obs} \mid H_0] = \frac{\#(\theta^{(i)} \geq \theta_{obs}) + 1}{N_p + 1}$$

avec N_p le nombre de permutations et # ($\theta^{(i)} \geq \theta$obs) le nombre de fois où θ est supérieur ou égal à θ_{obs} parmi les pseudo-échantillons i = 1, …, 2000.

-(2) Pour chaque population, les différences entre la distribution stables en stade et la distribution en stade observée, puis des distributions stable en stade entre les deux types de milieu ont été testées par **Δ de Keyfitz**, qui permet de comparer deux vecteurs de probabilité (Δ(x,w) = ½ Σi |xi-wi| avec x et w les deux vecteurs de i-éléments à comparer).

-(3) Afin de mettre en évidence l'origine des différences de taux d'accroissement asymptotique entre milieux, des **analyses des réponses des paramètres démographiques** (Life Table Response Experiment, LTRE) ont été réalisées. Les LTRE mettent en relation les variations observées de λ avec celles des paramètres démographiques, et sont donc des analyses rétrospectives (Caswell 2000), et permettent donc de mettre en évidence les paramètres contribuant à la différence de taux d'accroissement asymptotique entre plusieurs matrices (Bruna et Oli 2005, Ehrlen *et al.* 2005, Jongejans et De Kroon 2005), ces contributions dépendant non seulement des différences de paramètres mais aussi de leur sensibilité. Sensibilité de λ à a_{ij} :

$$s(a_{ij}) = \frac{\partial \lambda}{\partial a_{ij}}$$

Ces LTRE ont été réalisées même si les différences de taux d'accroissement entre milieu ouvert et fermé n'étaient pas significatives : en effet, des compensations peuvent survenir dans le cycle de vie, conduisant à de faibles différences de λ, alors que les paramètres de transition diffèrent fortement. L'analyse a consisté à comparer pour chaque site la dynamique en milieu fermé et ouvert en utilisant des LTRE à 1 facteur fixe (milieu) à 2 niveaux (ouvert/fermé). La matrice de référence utilisée est celle en milieu fermé $A^{(fermé)}$. Les matrices des différences entre les deux milieux est D = $A^{(ouvert)}$-$A^{(fermé)}$, et les matrices des contributions sont calculées de la façon suivante : C = D o $S_{A\dagger}$ (produit de Hadamard , multiplication terme à terme) avec $S_{A\dagger}$ la matrice de sensibilité de $A^{\dagger}$, avec $A^{\dagger}$ = ($A^{(ouvert)}$+$A^{(fermé)}$)/2 (Caswell 2001). Des contributions positives pour une transition donnée indiquent que la valeur de cette transition est plus forte en milieu ouvert que fermé. Les intervalles de confiances des contributions de chaque transition ont été calculés par bootstrap (n = 2000) (Levin *et al.* 1996).

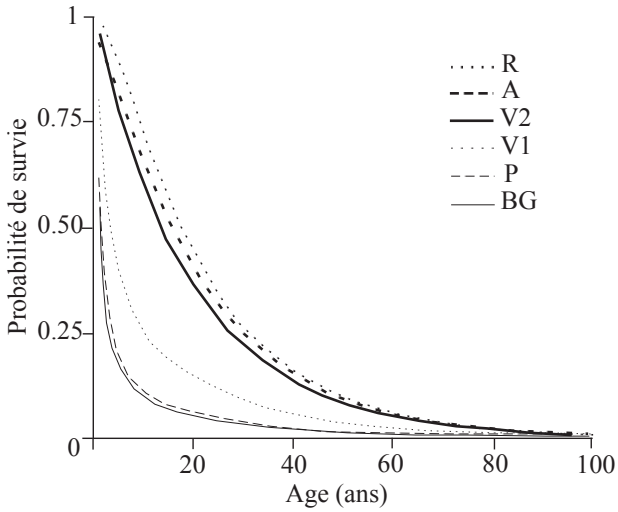


Figure 2.4. Distribution en âge des individus au sein de chaque stade (exemple de VIS, milieu ouvert).

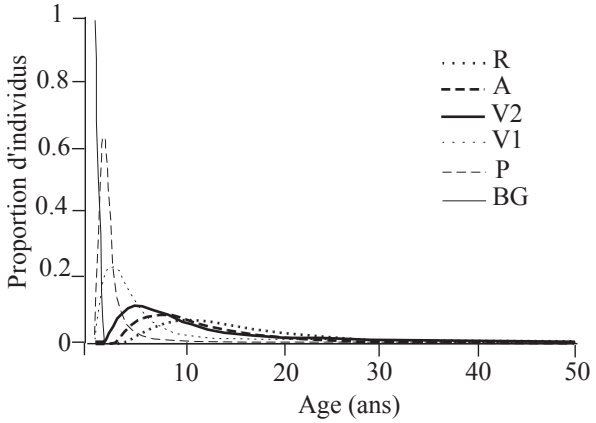


Figure 2.5. Courbes de survies pour chaque stade (exemple de VIS, milieu ouvert).

		BG	P	V1	V2	A	R
SFL	fermé	3.3 ± 10.6	11.2 ±21.3	18.8 ± 27.0	34.5 ±32.1	34.7 ±32.2	35.8 ±32.1
	ouvert	3.4 ± 4.7	3.6 ± 5.1	5.7 ± 6.8	11.6 ± 10.5	15.2 ± 11.1	15.9 ± 11.3
PSL	fermé	1.0 ± 0.0	6.8 ± 11.2	13.3 ± 14.3	17.4 ± 15.1	20.4 ± 15.6	22.4 ± 15.7
	ouvert	4.2 ± 8.4	4.2 ± 8.7	9.7 ± 13.6	18.5 ± 17.2	21.2 ± 17.4	20.5 ± 17.4
VIS	fermé	5.4 ± 10.7	5.0 ± 10.3	10.3 ± 15.5	20.6 ± 20.1	22.4 ± 20.6	24.0 ± 20.5
	ouvert	5.2 ± 12.7	6.4 ± 14.4	10.5 ± 19.4	30.0 ± 31.2	34.1 ± 31.6	33.9 ± 31.8
TAU	fermé	2.3 ± 4.0	2.9 ± 4.2	5.1 ± 7.4	12.8 ± 11.7	14.4 ± 11.8	15.9 ± 11.9
	ouvert	7.6 ± 22.6	9.4 ± 25.9	17.5 ± 34.3	39.7 ±46.1	47.2 ± 46.9	47.6 ± 47.0

Tableau 2.1. Moyenne et écart type de l'espérance de vie (temps moyen avant la mort) par stade, dans chaque site et milieu.

	PSL		STF		VIS		TAU	
	fermé	ouvert	fermé	ouvert	fermé	ouvert	fermé	ouvert
BG		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P	1.0	1.1	4.8	1.3	0.9	1.4	1.1	1.7
V1	2.3	3.4	9.2	3.1	2.9	3.3	4.4	4.0
V2	3.2	8.9	19.5	15.2	9.7	21.5	18.7	15.0
A	4.1	12.4	20.4	28.9	14.7	32.5	21.8	24.5
R	4.8	15.1	22.2	43.7	21.4	45.9	26.6	43.7

Tableau 2.2. Valeurs reproductives pour chaque stade dans chaque site et milieu, calculées relativement à la valeur reproductive du premier stade.

2.3.2.2 Résultats

Plusieurs caractéristiques démographiques sont liées au stade des individus. La gamme d'âge des individus des stades les plus avancés est plus étendue que celle des premiers stades (aplatissement des courbes de distribution en âge de chaque stade d'autant plus important que les stades sont élevés, figure 2.4) : ceci traduit la complexité du cycle démographique de la Pivoine, les individus des stades les plus élevés proviennent d'un plus grand nombre de trajets différents dans le cycle. Par ailleurs, la mortalité est très forte au début de la vie de l'individu et décroît de façon exponentielle par la suite (figure 2.5). La probabilité de survie des individus reproducteurs est donc proche de 1, et dans certains sites elle est même égale à 1 (cf. valeur des paramètres annexe 1). Deux explications sont possibles. La première est que les mortalités des reproducteurs sont si faibles qu'aucun évènement de mortalité n'a été détecté durant les 3 ans de l'étude, ce qui souligne encore la nécessité de mener des suivis sur le long terme pour les espèces longévives. Une deuxième explication est que les individus sénescents pourraient passer par une phase de régression (par exemple un stade végétatif). Le patron de mortalité de chaque stade influence l'espérance de vie, qui augmente donc avec le stade des individus. L'espérance de vie d'un individu entrant dans le cycle au stade graine est de 2.3 à 7.5 ans selon les sites et les milieux, celle d'un individu entrant au stade plantule est de 3.5 à 11.2 ans, alors que pour un individu commençant (hypothétiquement) sa vie comme reproducteur, elle serait de 15.8 à 47.6 ans (tableau 2.1). Enfin, le patron de mortalité influence aussi les valeurs reproductives : elles sont faibles pour les premiers stades et d'autant plus fortes que le stade est avancé (tableau 2.2).

Le taux d'accroissement asymptotique λ présente une variabilité inter- et intra-population. Les taux d'accroissements asymptotiques λ diffèrent selon les populations (figure 2.6). Ainsi au PSL, λ est significativement inférieur à 1 dans les deux types de milieu, indiquant une décroissance de la population si les conditions actuelles restaient constantes. Par contre à VIS, les deux parties de la population ont un λ significativement supérieur à 1, indiquant une croissance de la population. A STF, la partie de la population en milieu ouvert est à la limite de la stabilité (λ non significativement différent de 1, mais la valeur 1 se trouve à la limite supérieure de la distribution) alors que la partie en milieu fermé décroît. Enfin, à TAU la situation est particulièrement contrastée puisque le λ est particulièrement fort en milieu ouvert, alors qu' en milieu fermé il a la plus petite valeur observée de tous les sites. La comparaison des λ dans les parties des populations en milieu fermé et ouvert (par tests de randomisation) montre qu'il est significativement inférieur en milieu fermé qu'en milieu ouvert à TAU ($p < 0.001$), et qu'il n'y a pas de différence significative dans les trois autres sites (figure 2.6). Une tendance s'observe pourtant puisque dans trois populations sur quatre (PSL, TAU et VISS), le taux d'accroissement asymptotique est légèrement inférieur en milieu fermé qu'en milieu ouvert.

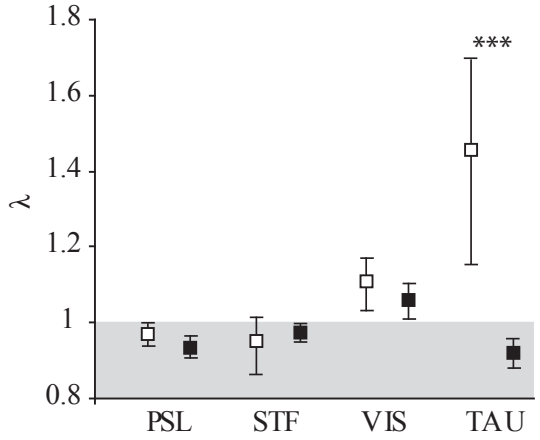


Figure 2.6. Taux d'accroissement asymptotique calculés dans chaque site et chaque milieu (blanc = milieu ouvert, noir = milieu fermé). Les intervalles de confiance correspondent aux valeurs des 2,5 et 97,5 centiles de la distributions en fréquence des λ obtenus par bootstrap et permettent de comparer la valeur des λ observés à 1. Les significativités des différences de λ entre les milieux ouverts et fermés (par tests de randomisation, IC correspondants n'apparaissant pas sur cette figure) sont indiquées.

Tableau 2.3 . Résultats des comparaisons par Δ de Keyfitz. A gauche : entre distribution stable et observées dans chaque site et milieu, à droite : entre structures en stade stable entre milieu ouvert et milieu fermé dans chaque site.

Site	Milieu	Δ
STF	ouvert	0.1507
	fermé	0.3928
PSL	ouvert	0.0931
	fermé	0.1404
TAU	ouvert	0.6238
	fermé	0.3316
VIS	ouvert	0.0546
	fermé	0.1211

Site	Δ
STF	0.4965
PSL	0.3102
TAU	0.7009
VIS	0.1339

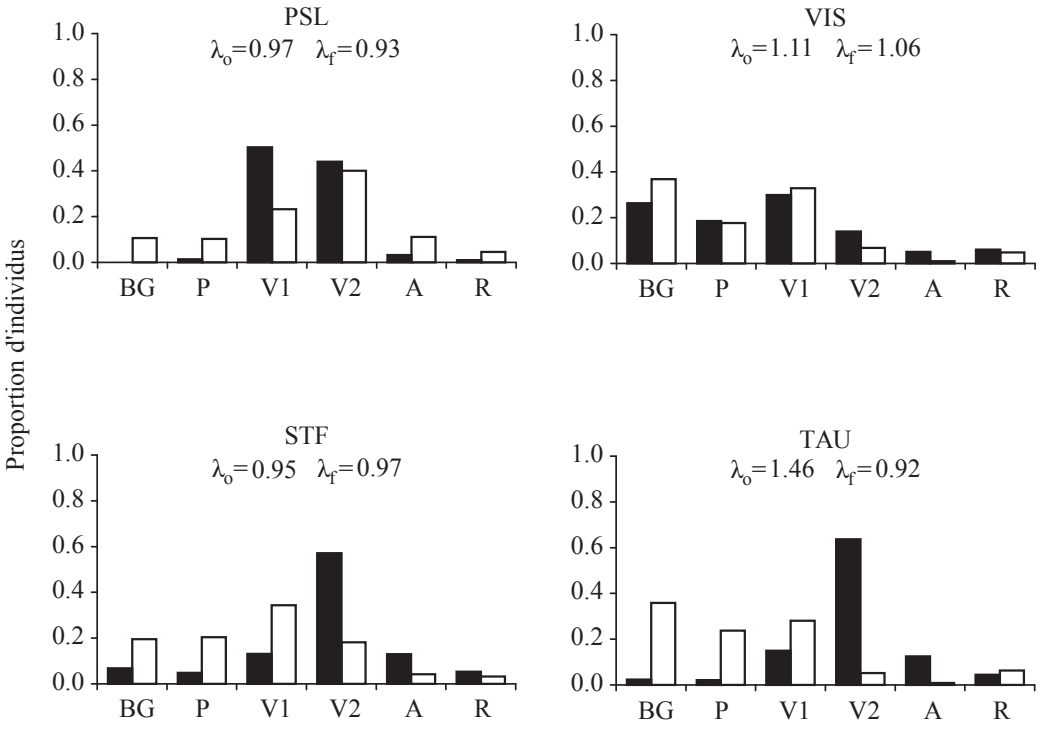


Figure 2.7. Distribution en stade stable pour chaque site et milieu (noir = milieu fermé, blanc = milieu ouvert). λ_o = λ en milieu ouvert, λ_f = λ en milieu fermé.

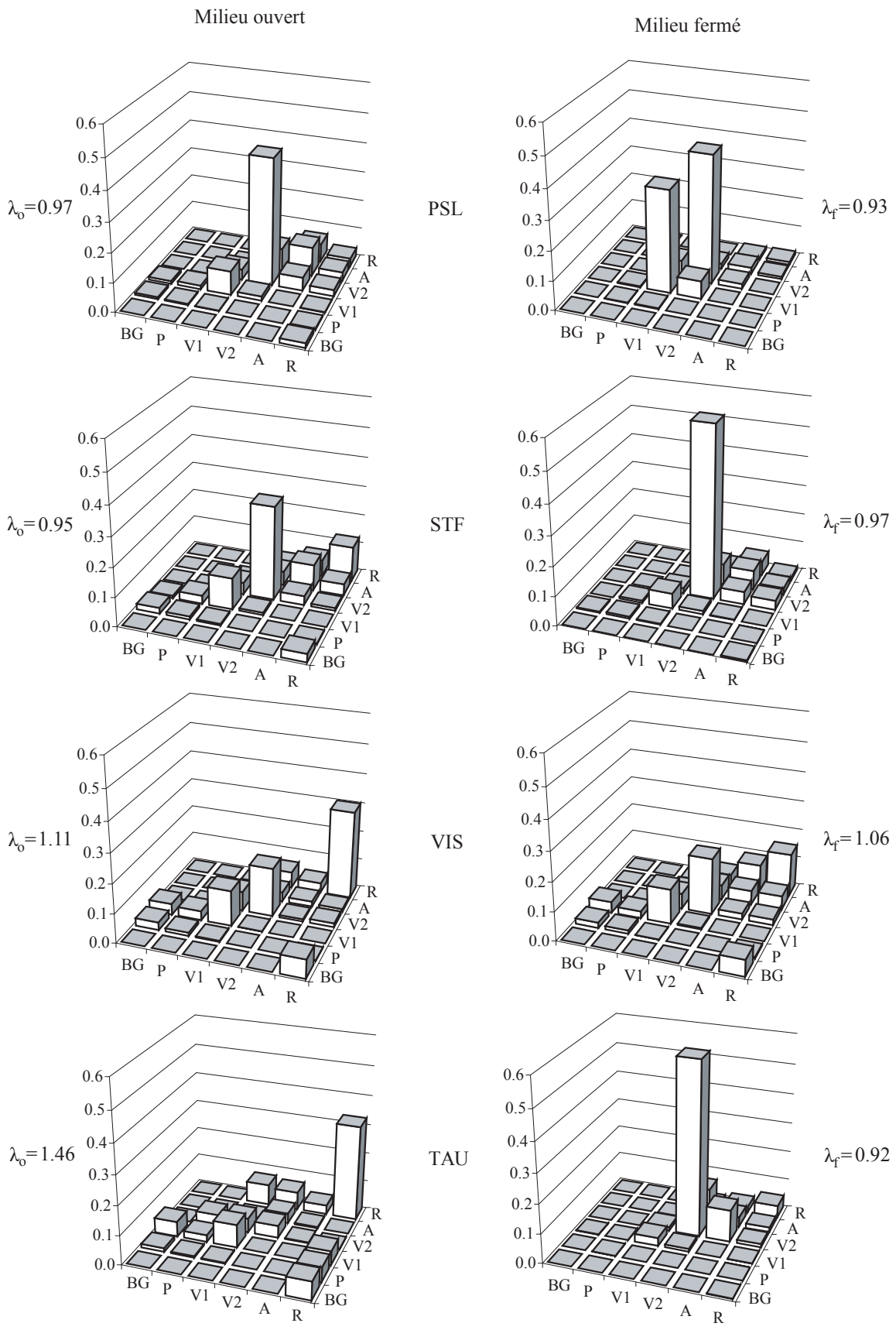


Figure 2.8. Valeurs des élasticité de λ aux paramètres de transition, en milieu ouvert et en milieu fermé pour chaque site (élasticités en y, stade au temps t en x et stade au temps (t+1 en z).

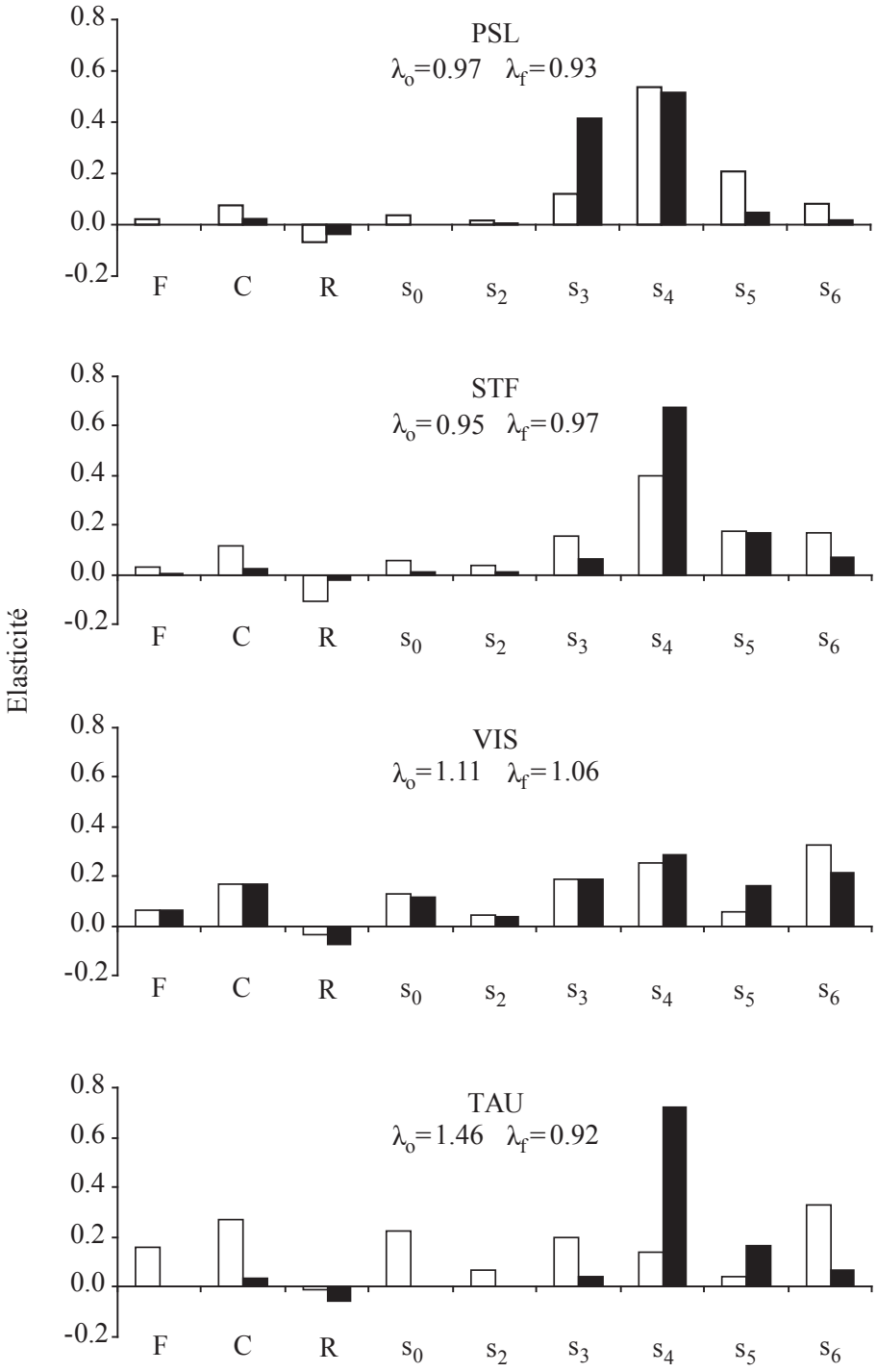


Figure 2.9. Elasticités du taux d'acroissement asymptotique à la fécondité (F), croissance (C), régression (R) et survie des individus (s_0 = des graines, s_2 = des P, s_3 = des V1, s_4 = des V2, s_5 = des A et s_6 = des R) dans chaque site et chaque milieu (noir = fermé, blanc = ouvert). λ_o = λ en milieu ouvert, λ_f = λ en milieu fermé.

La structure en stades stables (DSS) diffère entre les sites et milieux selon la valeur de λ. Lorsque $\lambda > 1$, la structure est du type dynamique (beaucoup de juvéniles, peu de végétatifs) alors que lorsque $\lambda \leq 1$, elle est de type régressif (peu de plantules, dominance des végétatifs) (tableau 2.3, figure 2.7). Les DSS pour tous les sites montrent aussi que la proportion d'individus reproducteurs est systématiquement faible (< 6.5 % des effectifs en tenant compte de la banque de graines, < 9.9 % sans la prendre en compte). Les comparaisons entre DSS et structure démographique observées mettent en évidence une grande différence entre les deux à TAU en milieu ouvert (tableau 2.3). Enfin, le "*damping ratio*" est élevé (1.25-2.08) ce qui suggère un taux de convergence rapide vers la structure stable.

Le taux d'accroissement asymptotique est peu sensible aux paramètres de fécondité mais très sensible aux paramètres de survie des adultes. L'analyse des élasticités de λ aux éléments des matrices et aux paramètres démographiques met en évidence que certaines caractéristiques sont communes à tous les sites et tous les milieux alors que d'autres diffèrent selon le taux d'accroissement asymptotique dans un milieu et site donnés.

Pour tous les sites et tous les milieux, les élasticités maximales de λ à chaque élément a_{ij} des matrices s'observent pour les individus adultes restant dans un même stade d'une année sur l'autre (figure 2.8 et annexe 1) : ils s'agit dans six cas sur huit des stades V2, et dans les 2 autres cas du stade R (TAU milieu ouvert et VIS milieu fermé). Les autres élasticités sont très faibles, excepté le stade V1 au PSL qui possède aussi une élasticité élevée). Les élasticités aux paramètres de fécondité sont faibles (< 0.065, sauf à TAU en milieu ouvert = 0.1621). Par contre, les élasticités aux survies sont très élevées dans tous les milieux et les sites, pouvant atteindre des valeurs au-delà de 0.5, et les élasticités aux survies des individus de stade V2 sont systématiquement élevées (0.1370 – 0.7214), et celles aux survies des P systématiquement faibles (0.0014 – 0.0711). Les élasticités aux croissances sont systématiquement faibles lorsqu'elles sont considérées individuellement (< 0.0642), et celles aux décroissances sont négatives, car elles provoquent une diminution de λ et sont faibles qu'elles soient considérées individuellement ou groupées.

Cependant, certaines élasticités diffèrent entre populations en croissance et en décroissance. Ainsi, le stade contribuant le plus à la valeur de λ est le stade R lorsque $\lambda > 1$ et le stade V2 lorsque $\lambda \leq 1$ (figure 2.8). De même, selon le site et le milieu, l'élasticité la plus forte concerne la survie des reproducteurs lorsque $\lambda > 1$, ou la survie des végétatifs V2 lorsque $\lambda \leq 1$. Les élasticités aux croissances groupées sont très faibles lorsque $\lambda < 1$ (0.0022 – 0.0760) et plus fortes lorsque $\lambda \geq 1$ (0.1175 – 0.2680). Les élasticités à la survie dans la banque de graines ne sont élevées que dans les sites et milieux dont $\lambda > 1$ (figure 2.9). Enfin, la seule partie de population ayant une élasticité à la fécondité forte est TAU (milieu ouvert), c'est-à-dire celle ayant le λ le plus élevé.

Les probabilités de transitions sont différentes entre milieu ouvert et fermé, en particulier celles concernant l'acquisition de biomasse et la reproduction. Les comparaisons des probabilités de transitions entre milieu ouvert et fermé (LTRE) montrent que les milieux ouverts

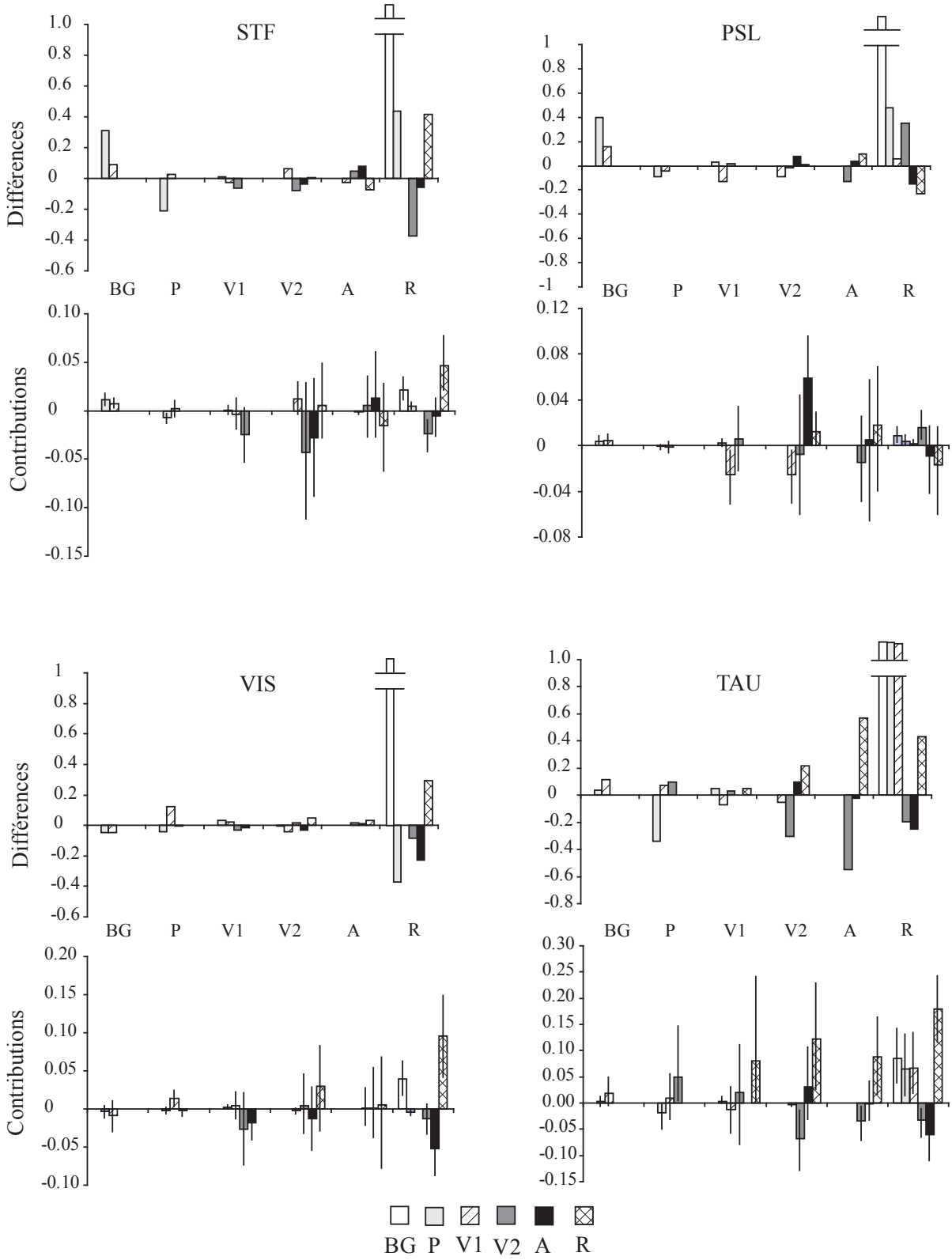


Figure 2.10. Résultats des LTRE comparant milieux ouvert et fermé dans chaque site : graphiques des différences entre paramètres, et graphiques des contributions de ces différences (avec leur IC 95%). Le stade des individus au temps t est indiqué sur l'axe des abscisses, le stade au temps t+1 est codé par des couleurs. Les valeurs des différences des transitions entre R et BG, P ou V1 étant largement supérieures à celles des autres transitions, les barres du graphique correpondantes ont été coupées pour faciliter la lecture.

sont caractérisés par de plus grandes probabilités de transitions allant dans le sens de progressions, moins de stases à l'état végétatif et moins de régressions (figure 2.10). Plus précisément, les transitions correspondant aux progressions vers le stade R et à la stase des individus dans le stade R sont plus élevées en milieu ouvert. Par contre, celles correspondant à des régressions (en particulier celles du stade R aux stades non reproducteurs) et aux stases des stades P, V1, V2 et A sont globalement plus élevées en milieu fermé (signe négatif des différences).

Premièrement, les probabilités de transitions correspondant à des progressions sont plus élevées et celles correspondant à des régressions sont plus faibles en milieu ouvert qu'en milieu fermé, ce qui peut illustrer des différences d'acquisition de ressources. Si la taille des individus (estimée par leur surface foliaire) permet de comparer des individus au sein d'un même milieu, elle ne permet pas de comparer les individus de milieu fermé avec ceux de milieu ouvert : en effet, des changements d'allocation se produisent en milieu fermé et il est courant que la surface foliaire des individus augmente alors que leur biomasse diminue lorsque les ressources lumineuses sont faibles (Stuefer et Huber 1998). D'ailleurs, pour la plupart des stades, la surface foliaire en milieu fermé est plus élevée qu'en milieu ouvert (données non montrées). La comparaison du nombre de feuilles entre individus de milieu ouvert et fermé est donc plus pertinente. Si l'on considère les stades morphologiques V2 et R qui possèdent au moins deux feuilles et dont les effectifs sont suffisants (année 2003), les individus de stade V2 ont moins de feuilles (PSL : $U = 1587$, $p = 0.001$) ou un nombre non significativement différent (STF : $U = 1051$, $p = 0.589$; TAU : $U = 384.5$, $p = 0.818$, VIS : $U = 1161.5$, $p = 0.697$) , mais pour le stade reproducteur, le nombre de feuilles est significativement plus grand en milieu ouvert (STF : $U = 42$, $p = 0.001$; TAU : $U = 128$, $p = 0.001$, VIS : $U = 201.5$, $p = 0.004$) (cf annexe 1).

Deuxièmement, les probabilités de transitions correspondant à un passage au stade R ou une stase dans le stade R sont plus élevées en milieu ouvert alors que celles correspondant à un passage du stade R à un stade végétatif sont plus faibles. L'exception est le PSL où le milieu ouvert est caractérisé par un fort turn-over V2-R, les probabilités de transitions V2-R et R-V2 étant plus élevées en milieu ouvert et celle de la stase dans le stade R étant plus faibles (figure 2.10). Des régressions logistiques mettent en évidence que la probabilité de floraison (en 2003) ne diffère pas entre sites (effet taille : $\chi^2_1 = 60.5$, $p < 0.001$; effet site : $\chi^2_3 = 3.9$, $p = 0.270$) mais diffère entre milieux au sein de chaque site (tableau 2.4), la probabilité de rester végétatif en milieu fermé étant de 2.6 à 7.8 fois supérieure à celle en milieu ouvert selon les sites. Cette probabilité de floraison dépend aussi de la biomasse des individus, ce qui sera abordé dans le chapitre 3.2.3. Par ailleurs, les proportions d'individus ayant fleuri 1, 2, ou 3 fois entre 2003 et 2005 diffèrent entre sites si l'on considère les milieux ouverts ($\chi^2_6 = 66.33$, $p < 0.001$), les individus fleurissant moins souvent au PSL et STF, et plus souvent à TAU. Au sein de chaque site (excepté PSL pour cause d'effectifs trop faibles), les proportions d'individus ayant fleuri 1, 2 ou 3 fois diffèrent entre milieu fermé et ouvert, les individus en milieu fermé fleurissant moins souvent que ceux en milieu ouvert (STF : $\chi^2_2 = 9.97$, $p=0.0068$, TAU : $\chi^2_2 = 21.25$ $p<0.001$, VIS : $\chi^2_2 = 7.79$; $p= 0.0203$).

Troisièmement, le succès reproducteur (i.e. le nombre de graines produites par les individus reproducteurs dont le devenir est le stade BG, P ou V1) est plus elevé en milieu ouvert. L'origine de

		$\chi^2$1 de Wald	*p*	Odds ratio
PSL	taille	28.20	<0.001	4.743 (95%ci : 1.032-21.807)
	milieu	3.99	0.045	
TAU	taille	22.04	<0.001	7.78(95%ci :2.828-21.406)
	milieu	15.79	<0.001	
VISS	taille	35.92	<0.001	2.622(95%ci :1.103-6.235)
	milieu	4.76	0.029	
STF	taille	22.93	<0.001	5.768(95%ci :2.474-13.448)
	milieu	16.46	<0.001	

Tableau 2.4. Régressions logistiques sur l'évènement de floraison. Le modèle testé est : probabilité de rester végétatif = taille + milieu dans chaque population. Un odds ratio d'une valeur x signifie que la probabilité pour un individu d'être végétatif (i.e. stade V2 ou A) en milieu fermé est x fois plus importante qu'en milieu ouvert.

	Ouvert	Fermé
PSL	1	1
STLO	1-3	1
TAU	1-10	1-3
VIS	1-5	1-2

Tableau 2.5. Nombre minimal et maximal de tiges florifères des individus dans chaque milieu de chaque site.

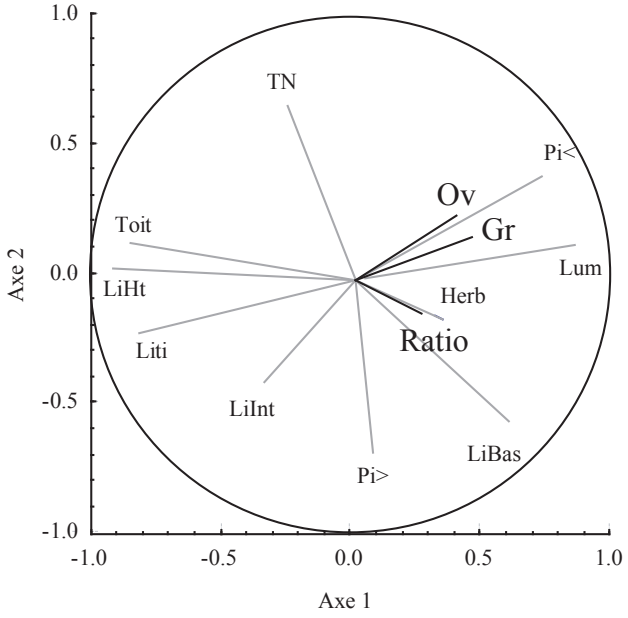


Figure 2.11. Cercle des corrélations de l'ACP réalisées sur les variables écologiques mesurées en 2003 par quadrat dans les 4 sites d'étude. Les variables supplémentaires sont indiquées en noir, et sont le nombre d'ovules moyen par quadrat (Ov), le nombre de graines moyen par quadrat (Gr) et le ratio graines / ovules moyen par quadrat (Ratio)(des individus n'ayant subi aucune prédation des carpelles). L'axe 1 explique 41.06 % de variance et correspond à un gradient de fermeture par les ligneux hauts (hauteur du toit, % de ligneux hauts et % de litière vs. % de lumière et % de petites pierres). L'axe 2, qui explique 16.16 % de variance, est un axe de favorabilité du sol (% grosses pierres vs. % terre).

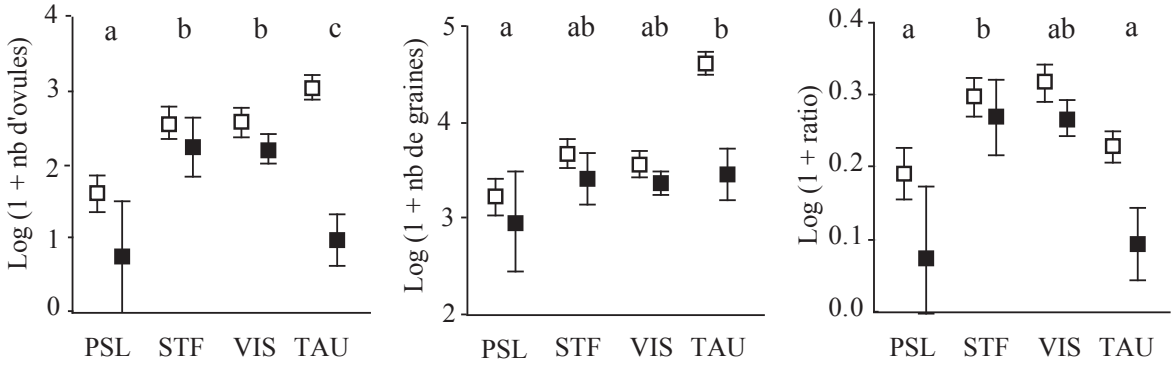
cette variation peut être due à une plus forte production de graines et / ou à une meilleure survie ou germination des graines.

La production de graines est plus importante en milieu ouvert. Ainsi, le nombre de tiges florifères par individu est différent entre sites et entre milieux, celui-ci étant plus faible en milieu fermé (tableau 2.5). Une ACP réalisée sur les variables écologiques mesurées dans les quadrats en 2003, avec la production moyenne de graines et d'ovules par quadrat en variables supplémentaires, met en évidence une corrélation significative de ces deux variables avec l'axe 1 (nombre d'ovules : r_{sp} = 0.410, $p < 0.001$; nombre de graines : r_{sp} = 0.436, $p < 0.001$) correspondant à un axe de fermeture par les ligneux hauts, et le nombre d'ovules est corrélé positivement avec l'axe 2 (nombre d'ovules : r_{sp} = 0.335, $p < 0.003$; nombre de graines r_{sp} = 0.100, $p = 0.402$) correspondant à un axe de favorabilité du sol et de colonisation par les ligneux bas (figure 2.11). Des ANOVA montrent que la reproduction potentielle (nombre d'ovules par individu), le nombre de graines et le ratio graines / ovules dépendent du site, du milieu, de leur interaction et de l'interaction année*site pour les deux derniers (figure 2.12). Ces résultats reflètent que la production de graines est plus importante en milieu ouvert mais la différence entre milieu est plus ou moins forte selon les sites

Les probabilités de transitions entre BG et les stades P ou V1 sont plus élevées en milieu ouvert, sauf à VIS où elles sont plus faibles, ce qui reflète des différences de taux de germination. L'étude de la germination sera abordée dans le chapitre 3.4.2.

En conséquence, les taux de reproduction net R_0 (nombre moyen de descendants par lesquels un individu sera remplacé à la fin de sa vie) sont inférieurs à 1, valeur en dessous du taux de remplacement des générations dans les sites et milieux ayant un $\lambda \leq 1$ (milieux ouverts et fermés de PSL et STF, milieu fermé de TAU) et supérieurs à 1 dans ceux ayant un un $\lambda > 1$ (milieu ouvert de TAU et les deux milieux de VIS) (tableau 2.6). Par ailleurs, dans tous les sites, les R_0 en milieu fermé sont plus faibles qu'en milieu ouvert. De même, les valeurs reproductives en milieu fermé sont plus faibles qu'en milieu ouvert (tableau 2.2). Parallèlement, les temps de génération T_g (tableau 2.6) sont plus longs en milieu fermé dans les sites avec des sempervirents (respectivement 3.3, 2.9 et 4.3 fois plus long en milieu fermé pour STF, PSL et TAU), et sont sensiblement identiques entre les deux milieux dans le site avec couvert décidu (1.1 fois plus long en milieu ouvert à VIS). Les temps de génération $\overline{T}$ suivent les mêmes variations, les valeurs pour les sites et milieux ayant un $\lambda \leq 1$ étant largement supérieures à l'espérance de vie des individus, ce qui indique ici encore que le turn-over n'est pas assez important pour que les générations puissent se remplacer (tableau 2.6).

Les probabilités de transitions les plus variables ne sont pas celles qui contribuent le plus à la variation de λ entre milieu ouvert et fermé. Les résultats des LTRE indiquent que bien que la majorité des transitions présente des variations entre milieu ouvert et fermé, peu d'entre elles contribuent de façon significative aux variations de λ entre milieux (figure 2.10). Par ailleurs, parmi celles-ci, peu ont des contributions fortes : la stase au stade R (sauf au PSL), la transition V2-R à PSL et les progressions vers le stade R et les transitions R à BG, P et V1 à TAU. Par contre, les contributions du stade BG sont très faibles, ainsi que celles des transitions R à BG,



	Nombre de graines			Nombre d'ovules			Ratio graines/ovules		
	ddl	F	p	ddl	F	p	ddl	F	p
année	2	4.37	0.013	2	1.16	0.314	2	3.34	0.037
site	3	12.11	< 0.001	3	20.04	< 0.001	3	29.84	< 0.001
milieu	1	44.41	< 0.001	1	26.87	< 0.001	1	22.33	< 0.001
année*site	6	4.65	< 0.001	6	0.84	0.541	6	4.48	< 0.001
année*milieu	2	0.08	0.92	2	0.24	0.788	2	0.04	0.958
site*milieu	3	16.71	< 0.001	3	11.45	< 0.001	3	3.21	0.023
année*site*milieu	6	0.26	0.953	6	0.06	0.999	6	0.62	0.715

Figure 2.12. Anovas sur les nombre de a) ovules, b) graines et c) ratio graines/ovules après transformation logarythmique, avec les facteurs année, site, milieu et leurs interactions. Les résultats des comparaisons multiples entre sites sont indiquées par des lettres. Dans tous les cas, les valeurs en milieu ouvert sont significativement supérieures à celles en milieu fermé. Les nombres de graines ont été significativement plus élevés en 2005 que les deux années précédentes.

	STF		PSL		TAU		VISS	
	fermé	ouvert	fermé	ouvert	fermé	ouvert	fermé	ouvert
Ro	0.12	0.30	< 0.01	0.34	0.01	92.77	3.26	10.58
Tg	79.88	24.38	95.07	32.87	51.90	12.04	20.68	22.65
T	210.84	31.956	481.87	6.1683	4234.8	46.641	16.338	15.332

Tableau 2.6. Nombre d'individus par lequel un reproducteur est remplacé à la fin de sa vie (Ro) et temps de génération (Tg et T) pour chaque site et chaque milieu

P et V1 pour tous les sites sauf TAU. Les valeurs des contributions des transitions aux variations de λ dépendent à la fois des valeurs des différences entre les paramètres dans chaque milieu et des valeurs de sensibilité de λ à ces paramètres. Une faible contribution peut donc être la conséquence d'une faible variation des paramètres et / ou des sensibilités. Ici, les transitions présentant les plus fortes variabilités (R à BG, P et V1) ont une contribution faible.

2.3.2.3 Discussion

Une espèce caractéristique des herbacées longévives

Le patron de mortalité de *P. officinalis* est classique : la mortalité des individus est plus forte dans les phases précoces de la vie, et diminue progressivement lorsque le stade démographique augmente (e.g. Barkham 1980, Oostermeijer *et al.* 1996, Valverde et Silvertown 1998), ce qui peut être dû à deux mécanismes. D'une part, les individus passent par le filtre de la favorabilité de l'habitat : les individus issus des graines disséminées dans les zones les moins favorables meurent dans les premiers stades de la vie, les individus adultes sont donc ceux qui ont survécu, car dans les zones les plus favorables. D'autre part, les individus adultes sont plus grands et ont vraisemblablement de plus grandes réserves souterraines (Hara et Wakahara 1994): ils sont donc plus à même de supporter des évènements stressants (sècheresse) et la prédation,…

Les plantes ont en général des espérances de vie longues : chez les herbacées pérennes, elle est en moyenne de 22.2 ans (Ehrlen et Lehtila 2002) et chez la Pivoine officinale elle est de 15.9-47.6 ans selon les sites et milieux. Les espèces dont les individus ont des durées de vie longues et des probabilités de survie importantes (et donc en contrepartie des fécondité faibles), ont des populations caractérisées par une forte persistance locale (remnant population) (Eriksson 1996, Garcia et Zamora 2003). Dans ces populations, les individus adultes peuvent persister longtemps après un changement de l'habitat (Schemske *et al.* 1994, Pierson et Turner 1998, Garcia *et al.* 1999) ce que l'on appelle l'inertie biologique (Summerfield 1972). Ceci leur permet donc de traverser des périodes défavorables, jusqu'au retour de conditions plus favorables (Eriksson 1996). Dans le cas de la Pivoine, ceci pourrait lui permettre d'attendre des réouvertures naturelles du milieu.

Des compromis entre survie et fécondité ont été détectés par des études comparatives basées sur des analyses d'élasticité des taux d'accroissement des populations aux paramètres démographiques, que ce soit au sein des mammifères (Heppell *et al.* 2000), des oiseaux (Saether et Bakke 2000) ou des plantes (Silvertown *et al.* 1993, Enright *et al.* 1995, Franco et Silvertown 2004). Chez les espèces pérennes longévives, comme *P. officinalis*, la survie des adultes joue un rôle plus important dans la croissance des populations (élasticité élevée) que le nombre de graines produites ou la survie des premiers stades de la vie (élasticité faible) (e.g. Charron et Gagnon 1991, Heppell *et al.* 2000, Ohara *et al.* 2001, Ehrlen *et al.* 2005). Par contre, les espèces dont les individus ont des durées de vie courtes présentent en général des élasticités à la fécondité élevées et à la survie adulte faibles.

Ces compromis existent aussi au niveau intra-spécifique, et l'importance de la fécondité par

rapport à la survie adulte dans le taux d'accroissement des populations dépend de la valeur du taux d'accroissement et donc des conditions locales (Oostermeijer *et al.* 1996, Valverde et Silvertown 1998) : cette plasticité permettrait d'exploiter l'hétérogénéité spatio-temporelle du milieu (Garcia et Zamora 2003). Ainsi, chez *P. officinalis*, lorsque les populations sont en décroissance ou à la limite de la stabilité (milieu ouvert limitant en eau ou en milieu fermé limitant en lumière), les élasticités à la fécondité sont très faibles, l'élasticité à la survie des stades végétatifs très forte et ceux-ci présentent une survie élevée. Par contre, dans les populations en croissance (milieu ouvert favorable ou milieu fermé par les caducifoliés), c'est la survie des reproducteurs puis celle des stades végétatifs, ainsi que la fécondité qui présentent les élasticités les plus fortes.

Ces résultats sont en accord avec les patrons d'élasticités mis en évidence chez d'autres espèces herbacées pérennes de milieu ouvert : lors de l'augmentation du couvert par des ligneux bas chez *Gentiana pneumonanthe* (Oostermeijer *et al.* 1996), lors de l'ouverture du milieu par des feux chez *Silene regia* (Menges et Dolan 1998), et chez des espèces présentes dans des clairières de taille et de degré de fermeture différent, *Primula vulgaris* (Valverde et Silvertown 1995), *Cynoglossum virginianum* (Cipollini *et al.* 1993), *Linderia benzoin* (Cipollini *et al.* 1994) et *Calathea ovandensis* (Horvitz et Schemske 1995). Ces patrons de variations des élasticités mettent en évidence que (1) proposer des stratégies de gestion basées sur l'étude des élasticités d'une seule population peut conduire à des erreurs (Silvertown *et al.* 1996) et (2) les paramètres ou les stades sur lesquels agir lors d'action de conservation vont changer entre populations et au sein d'une population en fonction de son taux d'accroissement. Ainsi, pour *P. officinalis* et les autres espèces longévives à faible fécondité, la gestion devra se focaliser sur la survie végétative pour les populations en décroissance, et sur la survie des reproducteurs et leur fécondité pour les populations en croissance (Oostermeijer *et al.* 1996, Garcia et Zamora 2003).

Facteurs influençant la dynamique des populations de Pivoines

La plupart des paramètres du cycle de vie en milieu fermé diffèrent de ceux en milieu ouvert. La première raison est que la limitation des ressources en milieu fermé provoque une acquisition de biomasse moindre : les individus ont un nombre de feuilles plus faible et vraisemblablement des réserves souterraines moindres (Barkham 1980, Whale 1984, Hara et Wakahara 1994), ce qui entraîne des stases et régressions plus fréquentes en milieu fermé alors que les progressions sont plus fréquentes en milieu ouvert. La deuxième raison est qu'il existe de fortes différences dans la reproduction : la probabilité de floraison et la fécondité sont inférieures en milieu fermé, ce qui est aussi lié à l'acquisition des ressources (cf. chapitre 3.1.4). Cependant, la relation entre le milieu et la dynamique des populations de pivoines n'est pas si triviale : bien que des différences de paramètres démographiques aient été observées entre milieu, elles ne sont pas forcément traduites par des différences de taux d'accroissement entre milieux.

Tout d'abord, il semble y avoir des différences de dynamique entre les populations sous couvert de sempervirents et celles sous couvert de décidus : les parties des populations dans les milieux fermés par des essences sempervirentes (PSL, STF, TAU) ne semblent pas être viables à

long terme, alors que celle en milieu fermé par des essences caducifoliées (VIS) semble viable, ce qui pourrait s'expliquer par la plus grande disponibilité en lumière sous les décidus (les Pivoines sont déjà en phase de floraison lorsque les décidus débourrent). Cependant, l'échantillon de populations dans cette étude est tel qu'il n'y a qu'une population colonisée par les ligneux décidus : l'ajout d'une autre population permettrait de confirmer ou d'infirmer le rôle des caducifoliés dans la dynamique des populations de Pivoine. Un autre indice allant dans ce sens est qu'en sous-bois de sempervirents, les pivoines se trouvent en général sous ou à proximité d'un feuillu isolé dans la matrice d'essences sempervirentes (à TAU, elles persistent principalement dans les inter-bandes de feuillus entre les sapins Douglas, on a donc 100 % des relevés sous caducifoliés, à PSL 36 % des relevés sous caducifoliés et STF 50 % des relevés sous caducifoliés). Il semble donc que dans les zones de fermeture les plus sévères par les sempervirents, une partie des individus ait déjà disparu, et il ne reste plus que ceux dans les zones où la disponibilité en lumière est légèrement plus importante, c'est-à-dire sous les feuillus isolés ou en petit groupe dans la matrice sempervirente.

Par ailleurs, le milieu ouvert ne semble pas ou peu favorable pour les deux populations dans les sites les plus chauds et secs (PSL, STF, figure 1.4) où, même si l'acquisition de biomasse et la fécondité sont meilleures qu'en milieu fermé, les populations sont en décroissance (PSL) et à la limite de la décroissance (STF), au moins durant les 3 ans de l'étude. Deux hypothèses peuvent donc être faites : (1) ce type d'habitat n'est pas favorable ou (2) les années de suivi correspondent à trois mauvaises années particulièrement chaudes et sèches qui ont eu plus d'impacts négatifs sur les populations en limite sud d'aire de distribution. Ceci ne pourra être vérifié qu'après plusieurs années de suivi, ce qui permettra de capturer la variabilité temporelle des paramètres démographiques et de prendre en compte la stochasticité environnementale, et de voir dans quelle mesure la viabilité de ces populations dépend du patron d'occurrence de mauvaises années. En effet, chez les espèces à durée de vie longue, il pourrait suffire d'une certaine fréquence d'évènements de recrutement sur la durée de vie de l'individu pour que la population puisse se maintenir(Menges et Dolan 1998, Pierson et Turner 1998). De plus, chez ces espèces, les populations dans lesquelles le recrutement ne se fait plus ne commencent à décroître que lorsque les plus vieux individus commencent à mourir (Schemske *et al.* 1994). Il faut donc rester prudent dans les conclusions, l'analyse de la dynamique présentée ici est préliminaire.

En ce qui concerne le PSL, la zone ouverte ($\lambda < 1$) est la conséquence d'une colonisation par les ligneux depuis les changements d'utilisation des terres (figure 1.2), mais cette colonisation est très lente sans doute pour des raisons géologiques (roche affleurante), et on a vu grâce aux structures démographiques que ce milieu était apparemment moins favorable que les lisières. A STF, où le milieu ouvert correspond à une coupe à blanc d'une parcelle dans le taillis, il ne semble pas y avoir de différences édaphiques entre milieu ouvert et fermé. Le faible taux d'accroissement asymptotique ($\lambda = 1$, mais à la limite de la significativité) indique qu'une coupe à blanc dans un tel site ne permet pas d'obtenir une population en croissance. Dans ce type de population, les lisières pourraient jouer un rôle important dans la dynamique et dans les modalités de gestion et ce rôle devra être précisé à la suite de cette étude.

Implications pour la gestion des populations

Cette étude de la dynamique de *P. officinalis* a permis de mettre en évidence trois points importants pour la gestion de ses populations.

Premièrement, les structures démographiques reflètent bien ici "l'état de santé" des populations (décroissance ou croissance) et, au moins pour cette espèce, permettraient d'avoir un suivi simple pour les gestionnaires, permettant d'évaluer la santé des populations et de suivre l'efficacité des actions de gestion menées

Deuxièmement, les comparaisons entre les structures démographiques observées et les structures en stade stable dans chaque type de milieu mettent en évidence une dissimilarité importante entre ces deux distributions pour TAU en milieu ouvert : le nombre de plantules prédit est beaucoup plus élevé que le nombre de plantules observé (tableau 2.3), ce qui pourrait être dû à la gestion de la population en milieu ouvert sur ce site. En effet, pour maintenir le milieu ouvert, l'ONF utilise du désherbant et coupe les repousses de ligneux, en évitant les placettes de semis, qui servent à estimer les probabilités de germination dans les matrices de transition (fort taux de germination dans les placettes), mais n'évitent pas les quadrats de démographie (très peu de plantules dans les quadrats). La différence entre le nombre de plantules observées sur le site et le nombre de plantules prédites à partir des placettes de semis pourrait correspondre à l'impact négatif de ces actions de gestion sur le recrutement, ce qui participerait à la valeur particulièrement élevée du taux d'accroissement de la population en milieu ouvert sur ce site.

Enfin, cette étude met en évidence que les taux d'accroissement des populations ne sont pas sensibles aux mêmes paramètres selon que les populations sont en croissance ou décroissance mais que les paramètres démographiques qui contribuent le plus au taux d'accroissement des populations sont ceux qui présentent le moins de variabilité et vice-versa, ce qui est couramment observé chez les plantes (Pfister 1998). Ce patron serait la conséquence de la pression sélective sur ces traits, limitant la variation des paramètres ayant des impacts forts sur le taux d'accroissement (Gillespie 1977, Benton et Grant 1996). Il existe néanmoins des cas où le taux d'accroissement asymptotique est fortement sensible au recrutement alors que ce dernier présente une forte variabilité (Pico *et al.* 2002), ce qui pourrait être sélectionné dans des environnements fortement variables : les pics de recrutement ainsi générés contribueraient alors à la persistance des populations. La conséquence directe est que les paramètres démographiques ou les stades sur lesquels une intervention de gestion permettrait le plus de faire augmenter le taux d'accroissement de la population ne sont pas forcément ceux sur lesquels une action de gestion à réellement un effet (Ehrlen *et al.* 2005). Afin de déterminer si une action de gestion permettrait de faire varier ces paramètres et si elle aurait un impact sur le taux d'accroissement des populations, une expérimentation d'ombrage et une gestion expérimentale par coupe du couvert ont été réalisées.

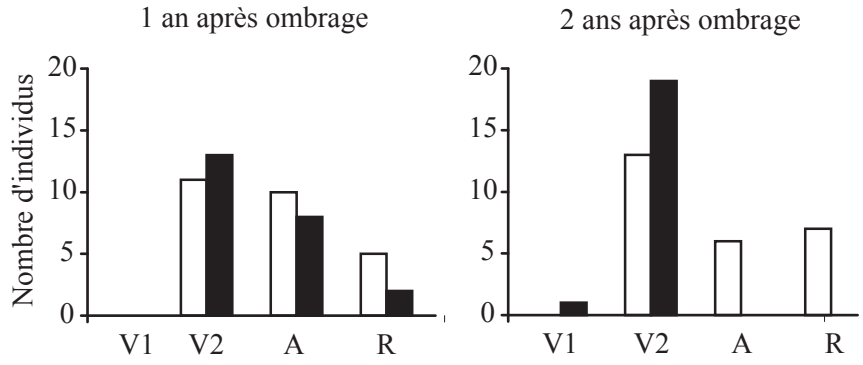


Figure 2.13. Nombre d'individus dans chaque stade morphologique aprèes 1 an et 2 ans d'ombrage artificiel (noir = ombrage, blanc = témoin).

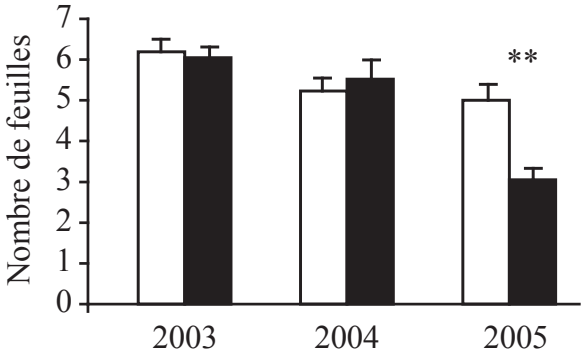


Figure 2.14. Nombre de feuilles des individus des plantes témoin (blanc) et ombragées (noir) les trois années consécutives de l'expérimentation, et niveaux de significativité des différences entre les deux traitements (Tests U de Mann whitney).

2.4 EXPÉRIMENTATIONS : OMBRAGE DES INDIVIDUS ET OUVERTURE DU MILIEU

L'étude de la dynamique des populations a permis de comprendre le fonctionnement des populations de *P. officinalis* dans deux environnements stables à l'échelle de l'étude : les milieux ouverts et fermés. La manipulation du milieu permet d'étudier comment les individus répondent à des variations de cet environnement. Deux expérimentations ont donc été menées afin de déterminer d'une part l'impact de la réduction de l'intensité lumineuse sur les individus reproducteurs (mimant une fermeture rapide du milieu), et d'autre part l'impact de l'ouverture du milieu sur la reproduction, la croissance, la survie et la structure démographique d'une partie d'une population.

2.4.1 Impact de la réduction de l'intensité lumineuse

Afin de déterminer l'impact de la réduction de l'intensité lumineuse sur les Pivoines, une expérimentation consistant à ombrer artificiellement des individus reproducteurs a été menée de 2003 à 2005 au PSL. En 2003, 49 individus florifères ont été identifiés, leur nombre de feuilles, ovules et graines ont été comptés. Parmi ces individus, 26 se trouvaient dans les quadrats de suivi démographique, et ont donc été utilisés en tant que témoins. Les 23 autres individus ont été affectés au traitement ombrage. Avant l'ombrage, le nombre de feuilles des individus des deux traitements n'étaient pas significativement différents (témoin: 6.2 ± 0.3; ombrage: 6.0 ± 0.3; $U = 286$, $p = 0.783$). Au printemps 2004, au moment de leur émergence, les individus du traitement ombrage ont été ombrés artificiellement grâce à des cônes en grillage recouverts de tissus interceptant en moyenne autant de lumière que le taillis de chêne vert sur le site (% interception de la lumière : ombrage artificiel = 89 ± 3 %, $n = 23$; milieu fermé = 93 ± 5 %, $n = 12$; $KW = 0.48$, $p = 0.487$). Ce dispositif permet de faire l'hypothèse que le seul facteur variant entre les deux traitements est l'intensité lumineuse : en effet, les cônes d'ombrage sont d'un diamètre réduit (environ 25 cm), tronqués et ouverts (ouverture de 10 cm de diamètre) à leur sommet et le tissu s'arrête à quelques centimètres de la base des cônes, ce qui permet d'éviter le plus possible des élévations de température et une interception des précipitations par les cônes. En 2004 et 2005, le stade morphologique, le nombre de feuilles, de graines et d'ovules de chaque individu ont été recensés.

L'impact de la diminution de l'intensité lumineuse n'a été perceptible que lors de la deuxième année d'ombrage. Ainsi, après une année d'ombrage, ni le nombre d'individus dans chaque stade morphologique ($X^2_3 = 1.5$, $p = 0.473$) (figure 2.13), ni le nombre de feuilles (témoin: 5.2 ± 0.3; ombrage: 5.5 ± 0.5; $U = 281.5$, $p = 0.720$) (figure 2.14) ne différaient entre les deux traitement. Après deux années d'ombrage artificiel, le nombre d'individus dans chaque stade morphologique différait significativement ($X^2_3 = 14.59$, $p = 0.002$) (figure 2.13) et les individus ombragés avaient significativement moins de feuilles que les individus témoins (témoins: 5.0 ± 0.4; ombragés: 3.0 ± 0.3; $U = 95.5$, $p < 0.001$) (figure 2.14). Le faible nombre (2004) ou l'absence (2005) d'individus reproducteurs dans le traitement ombré n'ont pas permis de tester l'impact de l'ombrage sur les variables de reproduction. A la suite de la rapide régression des individus ombragés, l'expérimentation

a été arrêtée fin 2005 afin d'éviter toute mortalité.

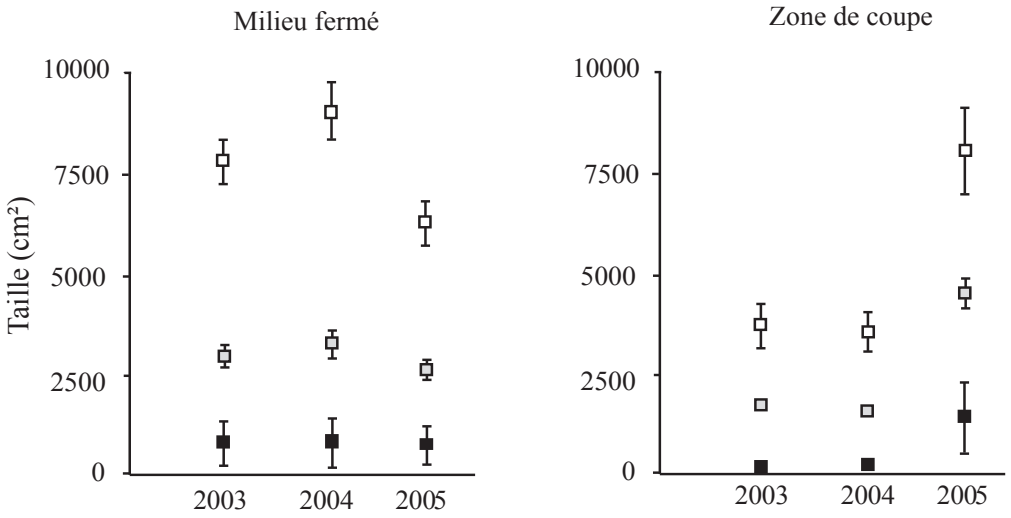
La Pivoine ayant des racines chargées de réserves, un délai entre le début de l'expérimentation et la réponse des individus était attendu. Cependant, la réponse a été particulièrement rapide, non seulement en ce qui concerne la taille des individus (le nombre de feuilles diminue) mais aussi la régression du stade reproducteur aux stades végétatifs (V2 et V1) : aucun individu ombragé n'a fleuri au bout de deux ans d'ombrage. La réduction de l'intensité lumineuse reçue par les Pivoines en sous-bois suffit donc à expliquer à la fois leur réduction de biomasse et leur état végétatif. Par contre, cette expérimentation ne permet pas de savoir si la réduction observée de biomasse aérienne est consécutive à une réduction de la biomasse racinaire (i.e. des réserves) ou due à une variation de l'allocation des ressources aux parties aériennes (plasticité).

La réduction de l'intensité lumineuse reçue par les pivoines dans cette expérimentation, même si elle correspondait à celle subie par les individus en sous-bois sur le même site, était particulièrement sévère. En effet, sur tous les sites d'études dont le milieu fermé est constitué d'essences sempervirentes (Chêne vert et Sapin Douglas), la majorité des Pivoines se trouve actuellement sous ou à proximité de quelques feuillus répartis dans la matrice de sempervirents. Ces individus souffrent certes d'une réduction importante de l'intensité lumineuse, mais sur une durée moindre que les individus sous les ombrages, puisqu'il y a un décalage phénologique entre l'émergence des Pivoines et le débourrement des feuillus.

2.4.2 Impact de la ré-ouverture du milieu

Méthodologie et résultats

Afin de déterminer les conséquences d'une réouverture du milieu, une expérimentation a été menée à TAU, de 2003 à 2005, en partenariat avec l'Office National des Forêts. En 2003, un groupe d'individus en sous-bois bien délimité dans l'espace a été cartographié et les modalités de suivi ont été les mêmes que celles des suivis démographiques. L'ONF a procédé à une coupe à blanc de la zone, soit une surface de 600 m², durant l'hiver 2003-2004, i.e. hors période de végétation des Pivoines. La pente sur la station étant forte, l'intervention n'a pas été accompagnée d'une utilisation d'engins lourds pouvant abîmer les bourgeons souvent superficiels, voire les racines des individus. Le suivi des plantes a été réalisé en 2004 et 2005 et sera poursuivi au-delà afin de déterminer si ce type de gestion est viable à long terme. Les suivis en milieu fermé et en milieu ouvert ont été utilisés comme témoins. L'évolution de la taille des individus en fonction de leur stade a été analysée grâce à des ANOVA de Friedman pour données répétées, en milieu fermé et dans la zone de coupe. En ce qui concerne les variables de reproduction, les données ont été considérées indépendantes entre années (ANOVA Kruskall-Wallis) compte tenu du nombre très faible de reproducteurs en 2003 et 2004 par rapport à 2005. Des tests de Chi² ont permis de comparer les structures démographiques entre années pour la zone de coupe et le milieu fermé. Enfin, les dynamiques en milieu fermé, ouvert et dans la zone de coupe on été comparées (voir annexe 2 pour les méthodes). Les matrices de transition des deux phases d'ouverture du milieu ont été calculées à partir des quadrats mis en place dans la zone ayant été coupée à blanc, et à partir des placettes de germination mises en place



		ANOVA Friedman		Tests de Wilcoxon 2003-2004		Tests de Wilcoxon 2004-2005		
milieu		*F*	*p*	*T*	*p*	*T*	*p*	*n*
fermé	V1	0.746	0.0689	51	0.379	6	0.345	17
	V2	27.80	< 0.001	767.5	0.201	271	< 0.001	62
	R	11.23	0.004	13	0.023	4	0.004	13
zone de coupe	V1	2.09	0.060	12	0.158	11	0.026	11
	V2	107.64	< 0.001	938	0.003	7.62	<0.001	77
	R	12.25	0.002	0.700	0.484	2.52	0.012	8

Figure 2.15. Variations interannuelles de la taille des individus (surface foliaire en cm²) selon leur stade en 2003 (V1 = noir, V2 = gris et R = blanc) en milieu fermé et dans la zone de coupe. Les variations interannuelles ont été testées grâce à des Anova de Friedman (données répétées), puis les comparaisons par années deux à deux ont été effectuées avec des tests de Wilcoxon pour échantillons appariés.

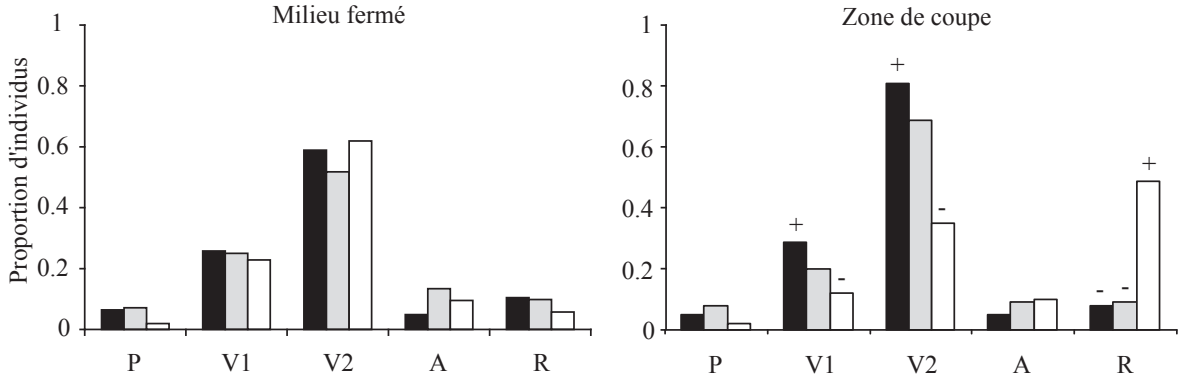


Figure 2.16. Proportions d'individus dans chaque stade morphologique en 2003 (noir), 2004 (gris) et 2005 (blanc) en milieu fermé et dans la zone de coupe. Les résultats des tests d'Habermann (cellules contribuant significativement à la significativité du χ^2) sont codés + si la fréquence observée est significativement supérieure à la fréquence théorique et - si elle est significativement inférieure.

en milieu ouvert.

Les résultats obtenus montrent d'une part que la réponse à l'ouverture du milieu concerne à la fois la croissance, la reproduction, la structure démographique observée et la dynamique, et d'autre part que cette réponse est rapide et n'est perceptible que la deuxième année après l'intervention, comme dans le cas de la réponse à la fermeture du milieu.

Tout d'abord, la taille (surface foliaire) des individus dans la coupe de stade V1, V2 et R en 2003 est restée sensiblement identique en 2004, puis a augmenté en 2005 (significativement pour les stades V2 et R) alors que celle des individus en milieu fermé a certes montré des variations interannuelles significatives, mais n'a pas augmenté en 2005 (figure 2.15). De plus, ces individus ont progressé dans les stades morphologiques. Ainsi, la structure démographique a changé dans la zone de coupe ($\chi^2 8 = 81.61$, $p < 0.001$) : la fréquence des individus végétatifs diminue au profit des individus reproducteurs, ces derniers passant de 8 individus en 2003 à 51 en 2005 (figure 2.16). En milieu fermé, la structure démographique est restée la même sur la même période ($\chi^2 8 = 10.86$, $p = 0.2097$) (figure 2.16). Dans la zone de coupe, non seulement le nombre d'individus reproducteurs augmente, mais parallèlement à leur augmentation de taille, le nombre d'ovules par plante, et donc le succès reproducteur potentiel, augmente, ainsi que le nombre de graines par plante et le ratio graines /ovules (figure 2.17, tableau 2.7).

Les taux d'accroissement asymptotique du premier couple d'années (2003-2004) sont de 0.9364 en milieu fermé (IC 0.882-0.985, $\lambda < 1$), 0.9273 dans la zone de coupe (IC 0.8706-0.9793, $\lambda < 1$) et en 1.4002 milieu ouvert (IC 1.262-1.704, $\lambda > 1$) : le λ de la zone de coupe est significativement différent de celui en milieu fermé ($p = 0.035$) et de celui en milieu ouvert ($p = 0.013$). Les taux d'accroissement asymptotique du deuxième couple d'années (2004-2005) sont de 0.8995 en milieu fermé (IC 0.828-0.958, $\lambda < 1$), 1.3005 dans la zone de coupe (IC 1.2759-1.6210, $\lambda > 1$) et 1.4884 en milieu ouvert (IC 0.927-1.800, $\lambda = 1$) : le λ de la zone de coupe est significativement différent de celui en milieu fermé ($p < 0.001$) mais pas de celui en milieu ouvert ($p = 0.188$). Le même schéma est observé en ce qui concerne les différences de distributions en stade stable de ces 4 types de milieu : la première année, la DSS de la zone de coupe est semblable à celle du milieu fermé (Δ de Keyfitz $= 0.127$) et très dissemblable de celle de milieu ouvert ($\Delta = 0.803$) alors que la deuxième année la DSS de la zone de coupe est semblable à celle du milieu ouvert ($\Delta = 0.142$) et très dissemblable de celle de milieu fermé ($\Delta = 0.790$). Par ailleurs, les DSS de la zone de coupe diffèrent entre les deux couples d'années ($\Delta = 0.588$). Enfin, les paramètres auxquels λ est sensible (élasticités de λ à la fécondité, croissance, régression et survie) sont très semblables entre le milieu fermé (matrice moyenne 2003-2005) et la première phase de la coupe, puis entre la deuxième phase et le milieu ouvert (matrice moyenne 2003-2005) : les élasticités sont élevées pour la survie des V2 dans les deux premiers milieux et pour la survie des reproducteurs et de la banque de graines, la fécondité et la croissance pour les deux derniers milieux (figure 2.18).

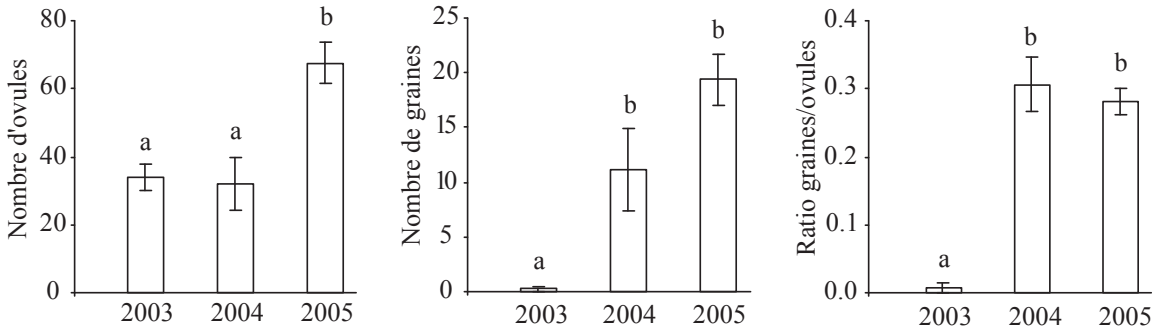


Figure 2.17. Evolution du nombre de graines, d'ovules et du ratio graines/ovules des individus reproducteurs de l'année précédant la coupe, la première et la deuxième année après la coupe. Les différences significatives entre années (tests post hoc consécutifs à des ANOVA de Kruskall Wallis) sont indiquées par des lettres différentes.

	2003		2004		2005			
	Moyenne	Erreur Type	Moyenne	Erreur Type	Moyenne	Erreur Type	KW	p
Nb de tiges	1.0	0.0	1.3	0.2	1.5	0.1		
Nb de carpelles	1.7	0.2	2.3	0.6	3.3	0.2		
Nb de graines	0.25	0.25	11.11	3.78	19.41	2.33	23.22	< 0.001
Nb d'ovules	34.00	3.90	32.00	8.00	67.61	6.20	18.53	< 0.001
Ratio graines/ovules	0.0068	0.0068	0.3064	0.0408	0.2816	0.0197	21.13	< 0.001

Tableau 2.7. Comparaison des variables de reproductions des individus de stade R entre les trois années. Les données ont été considérées indépendantes entre années (ANOVA de Kruskall-Wallis, 2003 n = 8, 2004 n = 9, 2005 n = 49).

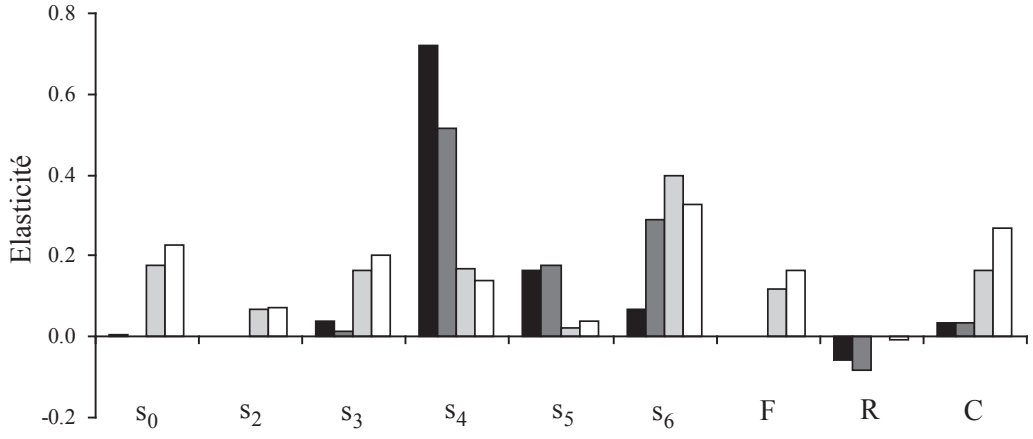


Figure 2.18. Elasticités de λ aux paramètres de croissance, régression, survie et fécondité à TAU en milieu fermé (noir), la première année de la coupe (gris foncé), la deuxième année de la coupe (gris clair) et en milieu ouvert (blanc).

Une réponse très rapide à la réouverture du milieu

La réponse à l'ouverture du milieu est rapide, mais elle n'est perceptible que la deuxième année après la coupe. Ce décalage de la réponse de cette espèce géophyte peut ici encore s'expliquer par les ressources accumulées dans les racines. La croissance en 2004 s'est faite principalement sur les réserves de 2003 (accumulées alors que la zone était fermée par les ligneux), et donc on n'observe pas de changements de biomasse, stade ou nombre d'ovules en 2004. Par contre, la croissance en 2005 se fait sur les réserves accumulées en 2004, vraisemblablement bien supérieures à la suite de l'augmentation de l'intensité lumineuse reçue : la taille des individus, le nombre de reproducteurs (Barkham 1980, 1980, 1992, Ne'eman 2003) et la production d'ovules augmentent. Néanmoins, le nombre de graines produites par plante augmente dès la première année après la coupe et on observe une très forte augmentation du ratio graines/ovules entre 2003 et 2004 (figure 2.17). Deux mécanismes différents ont pu permettre cette déconnection entre augmentation du nombre d'ovules et de graines produites. Il pourrait s'agir d'une augmentation brutale de l'efficacité de la pollinisation lors de la coupe (meilleure attractivité dans le milieu ouvert). Il pourrait aussi s'agir d'un ajustement de l'allocation des ressources à la production de graines : les ressources racinaires en 2004 ont peut-être été insuffisantes pour permettre une augmentation du nombre d'ovules, mais celles acquises durant la période de végétation ont pu être suffisantes pour permettre la maturation de graines supplémentaires.

Lors de l'ouverture du milieu, on aurait pu s'attendre à un passage progressif d'une dynamique de type 'milieu fermé' à une dynamique de type 'milieu ouvert'. Or ici, on observe un passage rapide et non progressif entre les deux : la dynamique l'année suivant la coupe est semblable à celle en milieu fermé, et celle la deuxième année après la coupe est semblable à une dynamique de milieu ouvert. Il serait intéressant de savoir si ce type de passage est courant chez les espèces végétales, et s'il correspond à une caractéristique des espèces adaptées à répondre à des modifications rapides de leur environnement.

L'ouverture du milieu a conduit à une meilleure croissance des individus et donc en conséquence à une meilleure floraison et fécondité, et à une meilleure survie (cf. matrices de transition). Ce mode de gestion permet donc d'agir sur les paramètres auxquels λ est le plus sensible, c'est à dire la survie adulte (paramètres auquel λ est le plus sensible lorsque les populations sont en décroissance) et la fécondité et la survie des reproducteurs (paramètres auquel λ est le plus sensible lorsque les populations sont en croissance). Cette espèce répond donc bien à une gestion simple du milieu, consistant à ouvrir le milieu, dans un site soumis à un climat où l'influence océanique est plus marquée que l'influence méditerranéenne. Par contre, l'intervention humaine semble avoir provoqué une surmortalité des individus de stade P et V1 par rapport aux milieux ouvert et fermé (tableau 2.8). Le sol sur le site étant particulièrement meuble, la perturbation du sol causée par l'intervention a probablement contribué à cette mortalité des stades P et V1, dont les individus ont un un bourgeon terminal fragile et un système racinaire peu développé. Ce facteur est à prendre en compte lors des gestions des populations dans les populations où le nombre de plantules est particulièrement faible, mais la surmortalité sur ces stades devrait avoir un faible impact sur leur

taux d'accroissement (élasticités de λ aux survies des P et V1 faibles, cf chapitre dynamique des populations). Par ailleurs, si cette mortalité venait à affecter les individus de stades plus avancées (V2, A et R), l'impact sur le taux d'accroissement des populations devrait être sévère chez cette espèce longévive (très forte sensibilité de λ aux survies adultes) : les interventions lors de la gestion devront donc se faire avec beaucoup de prudence en utilisant uniquement des moyens légers et en proscrivant l'utilisation d'engin pour la coupe et l'évacuation du bois coupé.

Partie III

Impacts sur le cycle de vie

Caractériser les conditions écologiques qui régissent chaque composante de la niche de régénération d'une espèce (Grubb 1977), c'est-à-dire la production des graines (floraison, pollinisation, maturation des graines), la dissémination (dans le temps et dans l'espace), la germination, l'établissement et la croissance des individus, permet de comprendre par quels mécanismes l'hétérogénéité spatio-temporelle du milieu à un impact sur la dynamique des populations. En effet, les exigences écologiques des individus peuvent varier en fonction de leur stade, chacun peut donc être affecté de façon différente par des changements des conditions environnementales. L'étude de ces composantes permet alors de détecter des compromis entre les traits adaptés à la niche d'établissement des plantules et ceux adaptés à la niche des individus adultes et reproducteurs. L'étude de la niche de régénération est donc particulièrement pertinente pour les plantes pérennes et particulièrement pour celles inféodées aux milieux présentant une très forte variabilité spatio-temporelle, comme en région méditerranéenne (Thompson 2005).

L'hétérogénéité spatio-temporelle du milieu influence le succès reproducteur d'un individu au travers des mécanismes pouvant limiter la production de graines : la prédation des graines (Lavergne *et al.* 2005), les interactions entre limitation de la pollinisation et limitation des ressources (Zimmerman et Pyke 1988), l'allocation des ressources à la fonction mâle au détriment de la fonction femelle (Sutherland et Delph 1984), les coûts liés aux évènements de reproduction antérieurs (Obeso 2002), mais aussi des facteurs génétiques tels la dépression de consanguinité et l'auto-incompatibilité (Charlesworth 1989). L'hétérogénéité spatio-temporelle de la mosaïque d'habitat (sa structure et sa dynamique) peut ensuite affecter à la fois la prédation et la dissémination des graines (Russell et Schupp 1998, Alcantara *et al.* 2000) et les processus post-dissémination comme l'herbivorie (Prieur-Richard *et al.* 2002). Elle peut donc avoir des conséquences sur la persistance des populations et sur la dynamique à l'échelle de la métapopulation (Primack et Miao 1992, Johst *et al.* 2002), en particulier dans le cas d'espèces sans banque de graines (Baskin et Baskin 1998), avec des capacités de dissémination limitées dans l'espace (Johst *et al.* 2002), ou une faible fertilité (Lavergne *et al.* 2004). Or, les espèces rares présentent souvent ces paticularités (Gaston et Kunin 1997).

Dans le chapitre précédent, les stades et paramètres pouvant influencer la dynamique des populations de Pivoines officinales ont été identifiés. Dans ce chapitre, nous allons voir quelles sont les sources de variation de ces paramètres démographiques, en quantifiant l'impact de la progression forestière sur (1) la reproduction (sur la floraison, la pollinisation, l'allocation des ressources à la production de graines) en relation avec la taille des individus, (2) les relations plantes/prédateurs et plantes/disséminateurs et (3) le recrutement des plantules (la dormance des graines, leur germination et la survie des plantules).

3.1 LA REPRODUCTION

3.1.1 Contexte

L'étude de la biologie de la reproduction est fondamentale en biologie de la conservation. D'une part ; les connaissances sur la biologie de la reproduction permettent d'identifier les causes et conséquences des variations de fécondité (Barkham 1980, Walck *et al.* 1999, Kery *et al.* 2000, Tomimatsu et Ohara 2002) qui peuvent modifier la dynamique des populations (Ashman *et al.* 2004). D'autre part, elles permettent d'estimer les risques encourus par les populations fragmentées et / ou à faibles effectifs (Ellstrand and Elam 1993), liés au système de reproduction, à la présence de système d'auto-incompatibilité ou à la biologie de la pollinisation (Neel 2002). L'ensemble de ces connaissances permet d'améliorer l'efficacité des stratégies de gestion et de restauration des populations, qui peuvent être très différentes en fonction du système de reproduction de l'espèce considérée (Neel 2002). Il est donc essentiel d'étudier les causes de la variabilité inter-annuelle et spatiale du succès reproducteur des individus, qui est souvent due à la combinaison de nombreux facteurs.

Chez les espèces qui dépendent des pollinisateurs pour leur reproduction, et particulièrement chez les espèces auto-incompatibles, le succès reproducteur est intimement lié à la disponibilité en pollinisateurs et à leur efficacité (Byers et Meagher 1992, Kearns *et al.* 1998). Ces dernières peuvent présenter des variations inter-annuelles, liées par exemple aux conditions climatiques durant la floraison, plus ou moins favorables aux pollinisateurs (Baker *et al.* 2000). Elles peuvent aussi présenter une variabilité spatiale : par exemple certaines espèces d'hyménoptères évitent les sous-bois sombres (Kreyer *et al.* 2004). De nombreuses études ont aussi montré un déficit en pollinisation dans des populations de petite taille ou isolées, peu attractives pour les pollinisateurs (Steffan-Dewenter et Tscharntke 1999, Groom 2001, Goverde *et al.* 2002, Johnson *et al.* 2004), et d'autant moins que l'abondance d'autres espèces de plantes attractives fleurissant en même temps est faible (Johnson *et al.* 2003). Les espèces dont les populations sont fragmentées dans une matrice forestière (Steffan-Dewenter et Tscharntke 1999, Groom 2001, Tomimatsu et Ohara 2002) ou menacées par la fermeture forestière pourraient donc présenter une limitation de la pollinisation.

Des facteurs génétiques peuvent aussi limiter la production de graines. Ainsi, en modifiant le comportement des pollinisateurs, l'hétérogénéité spatio-temporelle du milieu affecte les flux de gènes dans ou entre populations (Goverde *et al.* 2002). Chez les espèces présentant de la dépression de consanguinité, l'augmentation de l'apparentement peut alors conduire à une diminution du succès reproducteur des individus (Keller et Waller 2002, Willi *et al.* 2005) et influencer la dynamique des populations (Oostermeijer 2000). Par ailleurs, si l'espèce présente un système d'auto-incompatibilité, la dérive génétique peut gravement affecter le succès reproducteur des individus en causant une diminution du nombre d'allèles d'auto-incompatibilité (Charpentier *et al.* 2000, Young *et al.* 2000, Willi *et al.* 2005). Par contre, si les individus peuvent s'auto-féconder, l'assurance reproductive donne la possibilité pour des individus ou des groupes d'individus isolés de produire des graines en l'absence de pollinisateurs (Elle et Carney 2003).

Une fois un individu pollinisé par du pollen compatible, le nombre de graines produites dépend encore du niveau de ressources dont la plante dispose et de la façon dont ses ressources sont allouées à la reproduction (Reznick 1985, Bell et Koufopanou 1986). L'allocation des ressources à la reproduction peut différer entre individus au sein d'une même année. Ainsi, chez les herbacées pérennes, certaines composantes de la reproduction dépendent de la taille des individus comme la probabilité de floraison (Gross 1981, Hanzawa et Kalisz 1993, Worley et Harder 1996) ou encore la quantité de ressources allouées à la reproduction, qu'elle soit absolue comme par exemple le nombre de graines produites (Samson et Werk 1986, Ohlson 1988, Méndez et Obeso 1993), ou relative (i.e. ramenée à la taille) (Samson et Werk 1986, Klinkhamer et Meelis 1990, Klinkhamer *et al.* 1992). Chez les espèces hermaphrodites, les ressources peuvent aussi être allouées de façon différentielle entre la fonction mâle et la fonction femelle selon la taille des individus. Deux types d'arguments appuient l'intérêt adaptatif de cette allocation différentielle (Klinkhamer *et al.* 1997). Le premier est lié à l'existence chez les plantes pérennes d'un coût à la reproduction plus important via la fonction femelle que via la fonction mâle (dû par exemple à la production des graines ou des fruits). Dans ce cas, un individu de petite taille devrait allouer plus de ressources à la fonction mâle et augmenter son allocation de ressources à la fonction femelle lorsque sa taille augmente (Wright et Barrett 1999, Méndez et Traveset 2003). Le second est basé sur les variations de fitness en relation avec les variations d'investissement en ressources dans chaque fonction. La fitness peut ainsi être influencée par la taille des individus, dont peuvent dépendre la dissémination, la saturation des pollinisateurs, la geitonogamie, etc (Charnov 1982, Lloyd et Bawa 1984, de Jong et Klinkhamer 1994).

Enfin, les sur- ou sous-productions de graines une année donnée peuvent conduire à des modifications de floraison ou de fécondité les années suivantes. La survie adulte étant particulièrement forte chez les espèces pérennes, les coûts liés à la reproduction affectent surtout les évènements de reproduction (Ashman 1992, Agren et Willson 1994) ou de croissance (Primack et Hall 1990) ultérieurs. Dans le cas d'un déficit en pollinisation une année donnée chez une espèce à durée de vie longue, il pourrait donc être plus désavantageux de produire un faible nombre de graines en auto-fécondation (ce qui induirait un coût) que de n'en produire aucune (Morgan *et al.* 1997). Les coûts à la reproduction peuvent être étudiés en manipulant expérimentalement la reproduction. Cependant, chez les plantes qui stockent des réserves, il faut parfois prolonger l'expérimentation plusieurs années afin de pouvoir détecter un effet significatif (Primack et Hall 1990, Ehrlen et Van Groenendael 2001).

Les objectifs sont donc ici de quantifier la variabilité du succès reproducteur des individus et d'en identifier les sources. Le premier chapitre concerne le système de reproduction de la Pivoine officinale et répond à trois questions : la Pivoine officinale est-elle auto-compatible ? Peut-elle produire spontanément des graines en l'absence de pollinisateurs ? Les individus issus de croisements en auto-fécondation sont-ils sujets à la dépression de consanguinité ? Le deuxième chapitre concerne la limitation des transferts de pollen, et plus particulièrement sa variabilité temporelle et spatiale. Enfin, le troisième chapitre concerne les allocations des ressources à la reproduction en relation avec la taille des individus, entre années (coûts à la reproduction) et entre

les fonctions mâle et femelle. Les détails des méthodes et analyses statistiques se trouvent dans les articles en annexe 2.2 et 2.3.

3.1.2 Auto-incompatibilité et dépression de consanguinité

Méthodologie

Afin de déterminer le système de reproduction de la Pivoine officinale, trois types de pollinisations contrôlées ont été réalisés dans une population naturelle au Coulet en 2003 sur des individus échantillonnés au hasard. Afin d'éviter tout risque de pollinisation non contrôlée, des sacs en nylon ont été placés sur toutes les fleurs des plantes de l'expérimentation avant l'ouverture des boutons floraux, puis ont été ôtés quelques jours après la fanaison. Le traitement " auto-pollinisation spontanée " permet de mettre en évidence la capacité des individus à s'auto-polliniser sans intervention de pollinisateurs (n = 25 plantes). Les plantes du traitement " auto-pollinisation manuelle " ont été pollinisées à l'aide d'un pinceau, avec leur propre pollen, à trois reprises au cours de leur floraison (n = 24 plantes). Les fleurs ont été émasculées au fur et à mesure de l'avancement de la floraison. Les plantes du traitement " allo-pollinisation ", émasculées avant la déhiscence des anthères pour éviter tout risque d'auto-pollinisation, ont été pollinisées trois fois avec un mélange de pollen prélevé sur au moins 5 individus différents situées en dehors de l'expérimentation (n = 22 plants). Juste avant la déhiscence des carpelles, le nombre de graines et d'ovules de chaque fleur a été compté et les graines ont été collectées (avec autorisation). La même expérimentation a été réalisée l'année suivante sur les mêmes individus. Toutes les fleurs de chaque individu ont été manipulées afin d'éviter des biais liés à des réallocations de ressources entre fleurs manipulées et non manipulées (Knight *et al.* 2006).

Les différences de production de graines ou de follicules (i.e. de carpelles avec au moins une graine) entre les trois traitements ont été testées par des tests de Kruskall-Wallis puis des comparaisons multiples post hoc de Dunn, ou des tests U de Mann-Withney lorsque les effectifs de l'un des traitements étaient insuffisants. Les indices d'auto-fertilité (nombre de graines produites en auto-fécondation spontanée / allo-fécondation) et d'auto-compatibilité (nombre de graines produites en auto-fécondation manuelle / allo-fécondation) ont été calculés selon Lloyd et Schoen (1992) afin d'évaluer la propension des individus à s'auto-polliniser sans intervention de pollinisateurs et l'auto-compatibilité.

L'observation de la croissance des tubes polliniques de plantes assujetties aux trois types de pollinisations contrôlées a permis d'aborder la question du système d'auto-incompatibilité. Les pollinisations ont été effectuées au Coulet en 2005 sur 30 plantes (respectivement 17, 18 et 20 stigmates). Deux jours après la pollinisation, les styles ont été collectés et fixés au laboratoire dans une solution de FAA (Formol – Acide Acétique – Alcool absolu, William & Knox 1982). Les tubes polliniques ont ensuite été colorés à l'aide d'une goutte de bleu d'aniline à 0.1% et observés par fluorescence à l'aide d'un microscope muni de filtres UV. Le nombre de styles présentant (a) uniquement des tubes polliniques courts et majoritairement en dehors du stigmate, (b) au moins un tube pollinique long dans le style et (3) au moins un tube atteignant la base du style ont été

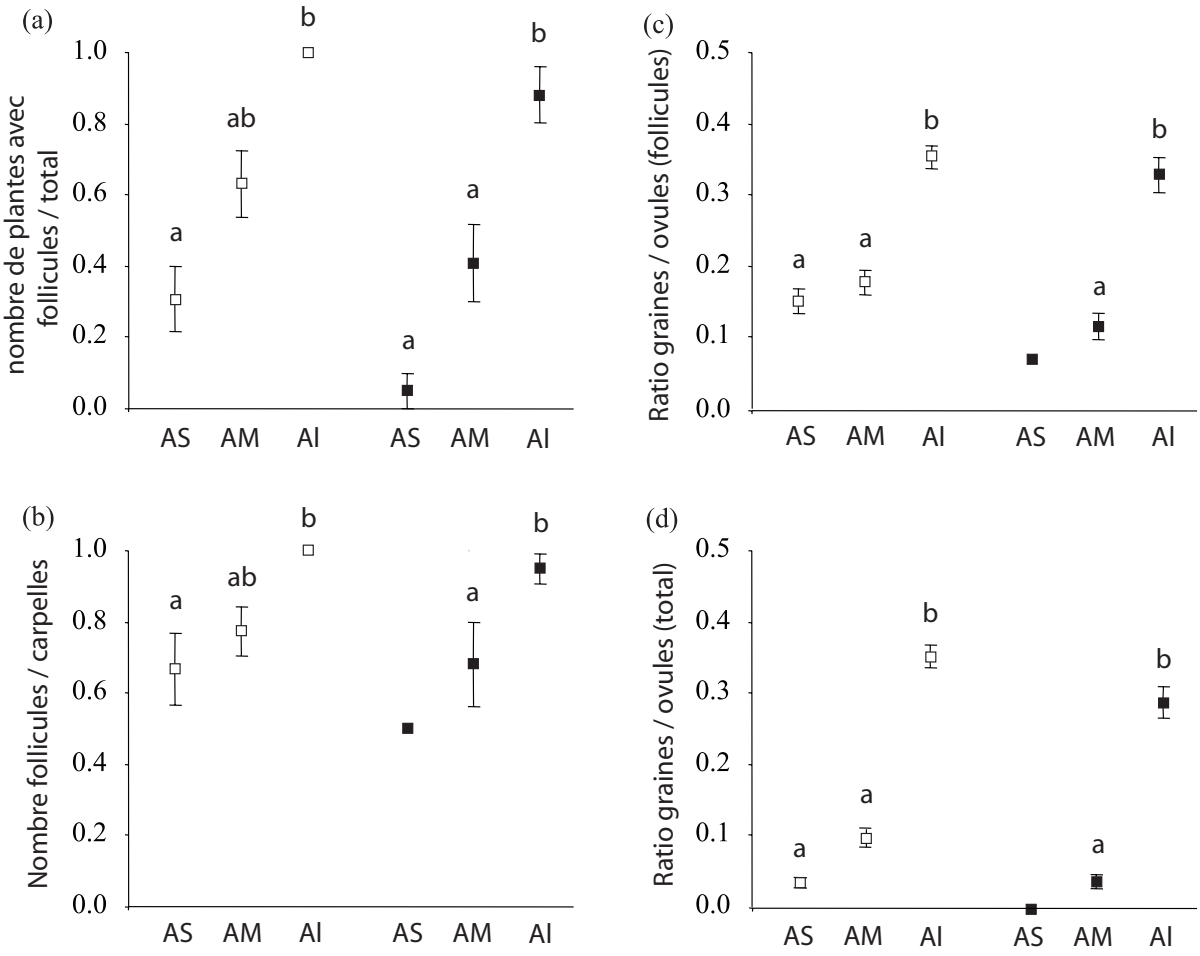


Figure 3.1. Valeurs Moyennes (± SE) du (a) nombre de plantes ayant produit au moins un follicule par rapport à celles qui n'ont développé aucun follicule, (b) ratio follicules / carpelles, (c) ratio graine/ovule uniquement calculé à partir des follicules et (d) ratio graine/ovule calculé par plante pour les traitements auto-pollinisation spontanée (AS), auto-pollinisation manuelle (AM) et allo-pollinisation (Al) en 2003 (blanc) et 2004 (noir). ((a) 2003 : KW = 25.52, $p < 0.001$, 2004 : KW = 25.66, $p < 0.001$; (b) 2003 : KW = 15.89, $p < 0.001$, 2004 : U = 37, $p < 0.05$; (c) 2003 : KW = 15.97, $p < 0.001$, 2004 : U = 18, $p < 0.01$; (d) 2003 : KW = 41.32, $p < 0.001$, 2004 : KW = 32.31, $p < 0.001$). Les traitements présentant des différences significatives ($p < 0.005$) sont codés avec des lettres différentes.

	Témoin	Auto-pollinisation manuelle	Allo-pollinisation	IAC
P. californica	0.2%	8.3%	26.6%	0.31
P. cambessedesii	35%	20%	40%	0.5
P. broteroi	29.5-25.3%	5.8-7.7%	32.2-29.3 %	0.250-0.263
P. officinalis	30.0-33.7 %	4.0-10.0 %	29.2-35.3 %	0.285-0.137

Tableau 3.1. Pourcentages du nombre d'ovules ayant donné des graines chez les individus témoin, après auto-pollinisation manuelle et allo-pollinisation et indices d'auto-compatibilité chez la P. officinalis (sur les deux années de l'étude) et trois autres espèces de Pivoines (mettre refs)

comparés entre les trois traitements à l'aide de tests de χ^2.

Enfin, la dépression de consanguinité a été étudiée à partir des plantules issues des pollinisations contrôlées. Les graines collectées en juillet 2003 ont été pesées et plantées en pots fin août 2003 sur le terrain d'expérience du CEFE. Les dates de germination (2004) et d'émergence (2005) des plantules issues des croisements en auto-fécondation (spontanées et manuelles) ou allo-fécondation ont été comparées par des analyses de survie (modèles de Cox). Le poids des graines, la hauteur et la surface (longueur*largeur) des feuilles des plantules ont été comparés grâce à des tests U de Mann-Whitney.

Auto-incompatibilité partielle et faible production de graines en l'absence de pollinisateurs

La Pivoine officinale est auto-incompatible (sensus Lloyd et Schoen 1992) : les plantes auto-pollinisées ont produit des graines mais en quantité significativement plus faible par rapport aux plantes allo-pollinisées. Ce résultat se retrouve à différents niveaux (nombre de plantes ayant produit au moins un follicule par rapport à celles qui n'ont développé aucun follicule, ratio du nombre de follicules / nombre de carpelles, ratio graine/ovule calculé par plante et calculé à partir des follicules) et pour les deux années de l'expérimentation (figure 3.1). Par ailleurs, l'indice d'auto-fertilité est faible (0.099-0.005 selon l'année) et plus faible que l'indice d'auto-compatibilité (0.285-0.137 selon l'année). Ces valeurs sont similaires à celles d'autres espèces proches (tableau 3.1). Or chez *P. officinalis* il n'y a ni séparation spatiale des anthères et des stigmates, ni séparation temporelle de la maturité des anthères et des stigmates : on observe ainsi que les stigmates sont complètement recouverts d'auto-pollen chez les individus du traitement " auto-pollinisation spontanée ". Ceci suggère un mécanisme empêchant l'auto-pollinisation spontanée. La présence d'une cuticule sur les stigmates (observable au microscope) et le fait que la majorité des tubes polliniques ne pénètre pas dans le stigmate chez les individus soumis à auto-fécondation spontanée (figure 3.2) suggèrent la présence d'une barrière mécanique. Cette cuticule, pouvant être rompue par l'activité des pollinisateurs, empêche ainsi la germination précoce de l'auto-pollen (Heenan 1998, Sigrist et M. 2004). Par ailleurs, le fait que les tubes polliniques des individus soumis à auto-fécondation aient une croissance perturbée (les tubes ne sont pas groupés en faisceaux traversant directement le style et peu atteignent la base du style) suggère la présence d'un mécanisme d'auto-incompatibilité.

Aucun indice suggérant de la dépression de consanguinité n'a été détecté en conditions contrôlées chez *P. officinalis*, que ce soit au niveau du poids des graines ou au niveau de la descendance (taux de germination et taille des plantules au bout de deux ans) (tableau 3.2). Cependant, l'expression de la dépression de consanguinité peut varier selon le stade des individus dans le cycle de vie : rarement détectée au niveau de la germination ou de la survie des plantules, elle est plutôt exprimée soit dès la maturation des graines chez les autogames, soit plus tardivement dans le cycle chez les espèces allogames et autogames (Husband et Schemske 1996). L'expression précoce de la dépression de consanguinité lors de la formation des graines peut ainsi participer à la différence de ratio graines / ovules observée entre les individus auto et allo-fécondés. L'expérimentation sera

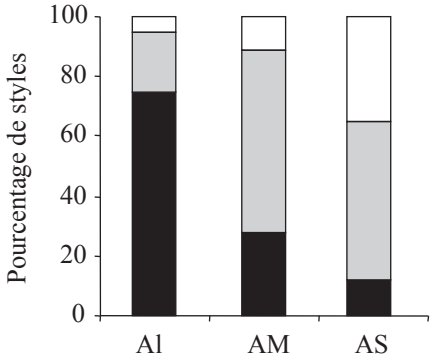


Figure 3.2. Comparaisons des proportions de styles comportant en noir uniquement des tubes polliniques très courts, en gris au moins un tube pollinique long dans le style et en blanc au moins un tube pollinique ayant atteint la base du style, pour les traitements allo-pollinisation (Al), auto-pollinisation spontanée (AS) et auto-pollinisation manuelle (AM). Les nombres de styles dans les différentes classes sont significativement différents entre traitements ($c24 = 19.95$, $p < 0.001$), ce qui est du à des différences entre les traitements Al et AS ($c22 = 15.29$, $p < 0.001$), et entre les traitements AS et AM ($c22 = 8.52$, $p < 0.025$), mais pas entre Al et AM ($c22 = 15.29$, $p > 0.05$).

	Auto-fécondation	Allo-fécondation	Indice de dépression de consanguinité	Tests utilisés	Statistique	p
Poids moyen des graines (g)	0.114 ± 0.005 (n=23)	0.102 ± 0.004 (n=23)	-0.122	U de Mann-Whitney	U = 189	0.097
Hauteur moyenne en 2005 (cm)	3.1 ± 0.1 (n = 20)	3.2 ± 0.1 (n = 23)	0.031	U de Mann-Whitney	U = 176	0.188
Surface foliaire moyenne en 2005 (cm^2)	41.3 ± 3.7 (n = 20)	37.2 ± 1.6 (n = 23)	-0.110	U de Mann-Whitney	U = 212	0.661
Date de germination (2004)	taux de germination : 0.8730	0.8069	-0.082	modèle de Cox	log rank test : $c^2 1$=2.811	> 0.05
					Wilcoxon : $c^2 1$ = 1.997	> 0.1
Date d'émergence (2005)				modèle de Cox	log rank test : $c^2 1$=0.238	> 0.1
					Wilcoxon : $c^2 1$ = 0.027	> 0.1
Mortalité durant l'hiver 2004-2005	4.5 %	4.7%				

Tableau 3.2. Comparaisons entre les traitements auto-fécondation et allo-fécondation des poids des graines, hauteur et surface foliaire des plantules moyens par plante mère et des dates de germination et d'émergence des plantules (moyennes ± SE). L'indice de dépression de consanguinité correspond à la différence des valeurs obtenues pour chaque traitement sur la valeur en allofécondation. Il n'y a pas de trade-off entre le nombre de graines produites par plante et leur poids moyen pour chaque traitement (auto-fécondation : (rsp = -0.169, $p > 0.1$, $n = 23$; allo-fécondation rsp = 0.120, $p > 0.1$, $n = 23$). Sur un total de 344 plantules, 16 sont mortes durant l'hiver 2004-2005.

donc poursuivie jusqu'à la floraison des individus, afin de détecter une expression tardive de la dépression de consanguinité sur la croissance, la floraison et la production de graines. Par ailleurs, les conditions de culture peuvent aussi faire varier l'expression de la dépression de consanguinité, celle-ci étant en général mieux détectée dans les milieux contraignants (Dudash 1987, Armbruster et Reed 2005).

La présence d'un système d'auto-incompatibilité chez *P. officinalis* est susceptible de poser des problèmes de viabilité des populations, mais seulement si les effectifs diminuent de façon trop importante (Willi *et al.* 2005). En effet, la taille effective d'une population doit être réduite très fortement pour que des allèles d'auto-incompatibilité soient perdus, à cause de leur sélection fréquence-dépendante (Byers et Meagher 1992). Des évènements de colonisation à partir d'un nombre réduit d'individus ont donc peu de chance d'aboutir à un succès. Cependant, la persistance de populations de taille relativement réduite ne semble pas compromise : la production de graines en auto-fécondation est possible en présence de pollinisateurs, même si le nombre de graines produites est alors plus faible qu'en allo-fécondation, et la descendance issue de ces croisements ne semble pas avoir une performance moindre (au moins les deux premières années de leur vie). Par contre, la probabilité de produire des graines pour un individu qui ne serait pas visité par un pollinisateur étant très faible, l'efficacité de la pollinisation est donc un processus clef chez cette espèce.

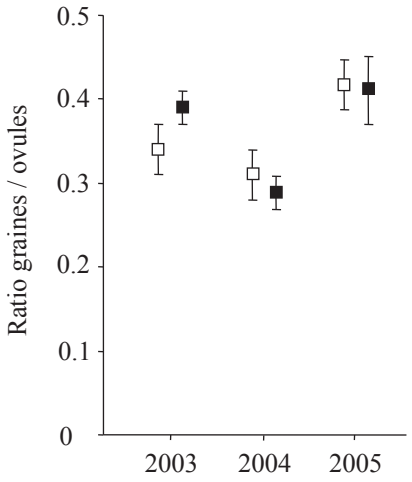
3.1.3 Limitation des transferts de pollen

Méthodologie

Deux expérimentations ont été menées afin de déterminer s'il existe une limitation de la pollinisation chez la Pivoine officinale qui pourrait réduire son succès reproducteur, et si cette limitation présente une variabilité temporelle et/ou spatiale. Toutes les fleurs de chaque individu ont été soumises au même traitement afin d'éviter des biais liés à des réallocations de ressources entre fleurs manipulées et non manipulées (Knight *et al.* 2006). La limitation de la pollinisation peut être mise en évidence grâce à des expérimentations permettant de comparer le succès reproducteur de plantes pollinisées de façon naturelle (témoins non manipulés) avec celui de plantes supplémentées en pollen (Bierzychudek 1981).

La première expérimentation a été menée au Coulet durant trois années consécutives, de 2003 à 2005. Des individus échantillonnés au hasard ont été attribués à deux traitements : (1) le traitement " témoin " (n = 25) où toutes les fleurs des individus sont uniquement soumises à la pollinisation naturelle, et (2) le traitement " supplémentation en pollen ", où toutes les fleurs des individus (n = 26) ont été pollinisées manuellement, à trois reprises, avec un mélange de pollen provenant de plus de 5 individus situés en dehors de l'expérimentation. Avant la déhiscence des follicules (juillet), les graines et ovules de chaque fleur ont été comptés.

Afin de quantifier l'impact de la fermeture forestière sur la pollinisation, une deuxième expérimentation a été menée à VIS en 2005. Des individus reproducteurs ont été échantillonnés



Variable	Effet	F	p
ratio graines/ ovules	traitement	F1,24 = 0.75	> 0.1
	année	F2,48 = 4.28	< 0.05
	année*traitement	F2,48 = 1.25	> 0.1
nombre d'ovules	traitement	F1,24 < 0.01	> 0.1
	année	F2,48 = 1.60	> 0.1
	année*traitement	F2,48 = 2.48	> 0.1

Figure 3.3. Moyennes (± SE) des ratios graines / ovule des individus des traitements témoins (carrés blancs) ou supplémentation (carrés noirs) en 2003, 2004 et 2005 au Coulet et résultats des ANOVA à mesures répétées. Premier modèle : pas de différences significatives de ratio graines/ovules entre traitements pour chaque année et de ratio graines/ovules entre années pour le traitement témoin, différences de ratio graines/ovules entre années pour le traitement supplémentation (ratio en 2004 inférieur à celui de (LSD Ficher: $p < 0.05$).

	Ordre	**Famille**		**Espèce**	**Nom commun**
pollinisateurs actifs	Hyménoptères	Andrenidae		*Andrena fulva, sp*	
		Halectidae		*sp*	
		Megachilidae		*sp*	
		Apidae	Apini	*Apis mellifera*	abeille domestique
			Bombini	*Bombus terrestris*	bourdon terrestre
	Coléoptères	Scarabaeoidae / scarabaeidae	Cetoniinae	*Tropinota hirta*	cetoine herissée
				Potosia cuprea	cetoine cuivrée
pollinisateurs passifs	Hyménoptères	Tenthredinoidea	Tenthredinidae	*Rogogaster picta* (Klug)	

Tableau 3.3. Récapitulatif des différentes espèces observées dans les fleurs de P. officinalis en train de rechercher activement le pollen (pollinisateurs actif) ou non (pollinisateurs passifs), sur les sites du Coulet et de VIS entre 2003 et 2005.

aléatoirement en milieu ouvert ($n = 60$) et en milieu fermé ($n = 60$) et ont été attribués aux traitements " témoin " et " supplémentation en pollen " (la majorité des individus ne portant qu'une fleur, ces traitements ont été appliqués sur une seule fleur par individu). Aucune expérimentation mettant en jeux des observations de pollinisateurs n'a été effectuée durant cette étude, mais différentes espèces ont pu être observées sur les sites du Coulet et de VIS lors du suivi d'autres expérimentations.

Une pollinisation particulièrement efficace

Même lorsqu'ils sont supplémentés en pollen, les individus de Pivoine officinale ont un ratio graines/ovules faible d'environ 35 %, comparable aux autres espèces de Pivoines (tableau 3.1). Ce faible ratio est couramment observé chez les géophytes pérennes (Wiens 1984, Baker *et al.* 2000, Griffin et Barret 2002) : une des hypothèses avancées pour l' expliquer est l'adaptation à une pollinisation ou à des ressources imprévisibles. Une sur-production systématique d'ovules permettrait d'augmenter la production de graines les années plus favorables (en ressources ou pollinisateurs) (Stephenson 1981, Burd 1995, Ashman *et al.* 2004).

Au Coulet, malgré des conditions climatiques très différentes lors des périodes de floraison en 2003, 2004 et 2005, aucun déficit en pollinisation n'a été mis en évidence (figure 3.3). L'indice d'auto-fertilité étant très faible chez la Pivoine officinale, ceci ne peut être expliqué par de l'assurance reproductive. Différents indices indiquent que le risque d'une limitation de la pollinisation en milieu ouvert chez cette espèce est faible. Tout d'abord, cette espèce est généraliste vis-à-vis de ses pollinisateurs : plusieurs espèces de gros hyménoptères et coléoptères ont été observées, soit collectant le pollen, soit consommant les anthères, soit utilisant la plante comme gîte (tableau 3.3). Ces insectes, communs dans la région d'étude, sont généralistes : il est donc peu probable qu'une disparition des pollinisateurs survienne, provoquant une limitation de la fécondité de la Pivoine. De plus, ses fleurs sont particulièrement attractives pour les pollinisateurs car elles possèdent des quantités très importantes de pollen. Enfin, la durée de vie des fleurs (environ six jours) est longue (Ashman et Schoen 1994, Ashman et Schoen 1996) ce qui assure une bonne pollinisation même si les évènements de pollinisation sont rares (obs. pers.).

A VIS, aucune limitation de la pollinisation n'a été observée ni en milieu ouvert, ni en milieu fermé (figure 3.4). Le milieu fermé est composé ici d'essences caducifoliées (*Q. humilis*) dont la foliaison ne débute qu'après la floraison des Pivoines. Le sous-bois est ensoleillé durant la période de pollinisation des Pivoines et ne serait donc pas défavorable aux hyménoptères pollinisateurs, qui y ont d'ailleurs été observés. Cette hypothèse n'a pu être confirmée en comparant ces résultats à ceux d'une expérimentation similaire dans des populations en sous-bois d'essences sempervirentes, car le nombre de Pivoines en fleurs est trop faible. Une autre hypothèse est qu'un autre facteur pourrait contraindre la production de graines supplémentaires chez les individus supplémentés en pollen. Haig et Westoby (1998) ont émis l'hypothèse que dans un environnement stable, les plantes pérennes pourraient allouer leurs ressources à la fonction femelle de façon à ce qu'elle soit limitée à la fois par la disponibilité en ressources et par l'efficacité de la pollinisation. Ainsi, une plante se trouvant à l'équilibre de Haig et Westoby ne peut produire de graines supplémentaires

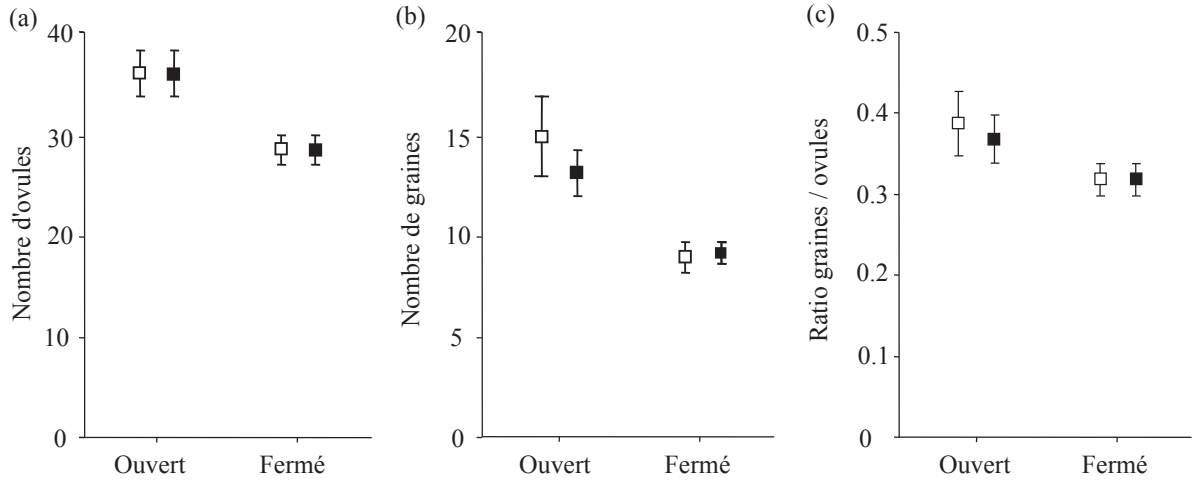


Figure 3.4. Valeurs moyennes (± SE) (a) du nombre d'ovules, (b) du nombre de graines et (c) du ratio graines/ovules des traitements témoins (blanc) et supplémentation (noir) en milieu ouvert et fermé à Vissec (2005). Il n'y a pas de différences significatives de nombre d'ovules et de graines entre les deux traitements ni en milieu ouvert (ovules : $U = 422$, $p > 0.1$; graines $U = 435$, $n = 29$; $p > 0.1$), ni en milieu fermé (ovules : $U = 374$, $p > 0.1$, graines $U = 322$, $n = 27$; $p > 0.1$). Lorsque les deux traitements sont combinés, les nombres d'ovules et de graines en milieu fermé sont inférieurs à ceux en milieu ouvert (ovules :$U = 1052$, $p = 0.001$; graines $U = 960$, $p < 0.001$). Les ratios graines/ovules ne diffèrent pas entre traitements (ANOVA, effet traitement : $F_{1,110} = 0.096$, $p > 0.1$), ce que l'on retrouve au sein de chaque milieu (LSD Fischer $p > 0.05$), mais sont significativement inférieurs en milieu fermé (effet milieu : $F_{1,110} = 5.41$, $p < 0.05$, l'interaction traitement*milieu n'étant pas significative ($F_{1,110} = 0.074$, $p > 0.1$).

suite à l'augmentation de l'une des ressources puisqu'elle est limitée par l'autre (Haig et Westoby 1988, Totland et Eide 1999, Ashman *et al.* 2004). A VIS, les individus en sous-bois sont plus petits et produisent moins de graines et d'ovules que les individus en milieu ouvert (figure 3.4). D'autres études ont montré que la fermeture du milieu pouvait provoquer une diminution de la floraison et du succès reproducteur chez les herbacées de milieu ouvert (Barkham 1980, 1980, Valverde et Silvertown 1995, Ne'eman 2003, Andrieu *et al.* 2006) en limitant en particulier les ressources lumineuses. Il semble donc que la production des graines est limitée par les ressources en sous bois, masquant une éventuelle limitation de la pollinisation.

Chez la Pivoine officinale, contrairement à ce qui est décrit dans la majorité des études, il ne semble donc pas y avoir de limitation de la pollinisation, malgré son faible indice d'auto-fertilisation. Il semble d'ailleurs que chez les herbacées pérennes, la limitation de la pollinisation ne soit pas systématique (Ehrlén 1992). Une récente méta-analyse met en évidence que l'incidence de la limitation de la pollinisation est sur-estimée, d'une part à cause d'un biais dans la publication des résultats (les études montrant une limitation de la pollinisation sont plus publiées que celles montrant que la pollinisation n'est pas limitée) et d'autre part à cause des protocoles et variables utilisés pour la quantifier (Knight *et al.* 2006). Enfin, si les conséquences démographiques d'une limitation de la pollinisation une année donnée peuvent être importantes chez les espèces dont les individus ont une durée de vie courte, celles sur les espèces dont les individus ont une durée de vie longue sont moindres (Knight *et al.* 2005), l'élasticité du taux d'accroissement des populations à la fécondité étant faible chez ces dernières.

3.1.4 Effet de la taille sur la reproduction

Méthodologie

Les objectifs de ce chapitre sont de déterminer comment les individus, en fonction de leur taille, allouent leurs ressources (1) à la reproduction, de façon absolue et relative, (2) entre la fonction mâle et la fonction femelle et (3) consécutivement à une production de graines faible ou importante. Comprendre les relations entre taille et allocation des ressources est important dans l'étude de l'impact de la progression forestière sur les populations de Pivoines officinales. En effet la taille des individus est directement dépendante de la qualité de l'habitat, ce qui permet ici d'identifier les causes précises de la réduction du succès reproducteur observé en milieu fermé.

Allocation des ressources à la reproduction – Les individus utilisés sont ceux du site du Coulet faisant partie (a) des traitements " allo-pollinisation ", " auto-pollinisation manuelle " et " auto-pollinisation spontanée " décrits précédemment dans le chapitre traitant du système de reproduction, (b) des traitements " supplémentation " et " témoin " décrits dans le chapitre traitant de la limitation de la pollinisation, et (c) du traitement " zéro " dans lequel les individus ont eut leurs anthères et stigmates coupés avant l'ouverture de la fleur afin de prévenir toute formation de graines. Ces traitements ont été appliqués en 2003 et 2004 et ont permis de manipuler expérimentalement le nombre de graines produites par ces individus. En 2005, tous les individus, exceptés ceux du traitement témoin, ont été supplémentés en pollen afin de mettre en relation le nombre de graines produites en 2003

		Pas de graine / maximum de graines		Pas de graine/auto-fécondation	
		Statistique	p	Statistique	p
Nombre d'individu végétatifs vs reproducteurs	en 2004	$\chi^2 1 = 2.22$	> 0.1	$\chi^2 1 = 2.48$	> 0.1
	en 2005	$\chi^2 1 = 0.38$	> 0.1	$\chi^2 1 = 3.30$	> 0.1
Nombre d'individus ayant fleuri 1,2 ou 3 fois		$\chi^2 2 = 0.19$	> 0.1	$\chi^2 2 = 5.83$	> 0.1
Nombre d'ovules en 2005		U = 934.5	> 0.1	U = 280	> 0.1
Nombre de graines en 2005		U = 941.5	> 0.1	U = 276.5	> 0.1
Ratio graines/ovules en 2005		U = 412	> 0.1	U = 108.5	> 0.1
Taille en 2005		U = 904	> 0.1	U = 295	> 0.1
Variation de taille entre 2003 et 2005		U = 908	> 0.1	U = 268	> 0.1

Tableau 3.4. Récapitulatifs des analyses portant sur le coût à la reproduction.

et 2004 avec des variables mesurées en 2005 : la floraison (test de χ^2), le nombre de graines et d'ovules, le ratio graines/ovules, la croissance et la taille (tests U de Mann-Whitney). Les individus reproducteurs des quadrats de démographie ont été utilisés afin de tester si les évènements de reproduction étaient dépendants de la taille des individus.

Allocation aux fonctions mâle et femelle – En Avril 2003, 40 individus reproducteurs ont été choisis aléatoirement au site du Coulet et ont été supplémentés en pollen en 2003 et 2004 afin d'estimer leur allocation à la fonction femelle sans biais dû à une potentielle limitation de la pollinisation (mélange de pollen provenant d'au moins 5 individus en dehors de l'expérimentation, appliqué au pinceau sur les stigmates tous les 2 jours durant la floraison, soit 3 fois en tout). Les carpelles, ovules et graines ont été comptés afin d'estimer l'allocation à la fonction femelle, et le nombre d'anthères et de grains de pollen par anthère pour celle à la fonction mâle. Le nombre d'anthères étant tel qu'il ne pouvait être compté sur le terrain avec précision, a été estimé à partir de photos numériques (*comptage sur photo* = 1.12 x *nombre exact d'anthères*, $r^2 = 0.99$, $p < 0.001$, $n = 32$). Le nombre de grains de pollen par anthère a été estimé à partir d'un échantillon de 10 anthères par fleur, à l'aide d'un compteur à particules (cf. annexe 2.2 pour le détail des protocoles). La taille des individus a été estimée à partir de leur surface foliaire (mesurée en sommant les longueur * largeur de chaque foliole, corrélation entre la surface et le poids sec des feuilles $r_{sp} = 0.923$, $p < 0.001$, cf article).

Le rôle prédominant de la taille des individus

Après avoir manipulé expérimentalement le nombre de graines durant deux ans, aucun impact de la sous- ou sur-production de graines n'a été détecté chez cette espèce, que ce soit au niveau de la floraison, de la production d'ovules et de graines, de la croissance (tableau 3.4) ou de la survie (aucune mortalité). Cette espèce ayant des réserves souterraines, il est possible que la détection de coûts à la reproduction nécessite une durée d'expérimentation plus longue. En effet, l'investissement de ressources dans la reproduction peut se faire au détriment des ressources stockées dans les organes de réserves et les effets peuvent alors se faire ressentir plusieurs années plus tard (Primack et Hall 1990, Ehrlen et Van Groenendael 2001). De même la comparaison entre les individus auto-pollinisés et les individus du traitement " zéro " (consistant à empêcher la production de graines) n'a pas permis de mettre en évidence un coût à l'auto-fécondation en 2005 (tableau R4). Produire des graines en auto-fécondation les années de faible succès de pollinisation pourrait donc permettre à un individu d'augmenter sa fitness. Si le faible indice d'auto-fertilisation indique que la production de graines par auto-fécondation spontanée est minime chez cette espèce, la pollinisation semble, elle, particulièrement efficace (cf. chapitre sur la limitation de la pollinisation), et donc la probabilité d'un sévère déficit en pollinisation semble faible.

Si les évènements de reproduction antérieurs ne semblent pas avoir d'impact sur la performance des individus, la taille des individus y joue un rôle majeur. Chez les plantes pérennes, des individus de taille différente peuvent présenter une croissance, une survie et/ou une reproduction différentes ((Méndez et Obeso 1993, Worley et Harder 1996, Valverde et Silvertown 1998), et peuvent être affectés différentiellement par les limitations en pollen et en ressources (Lawrence

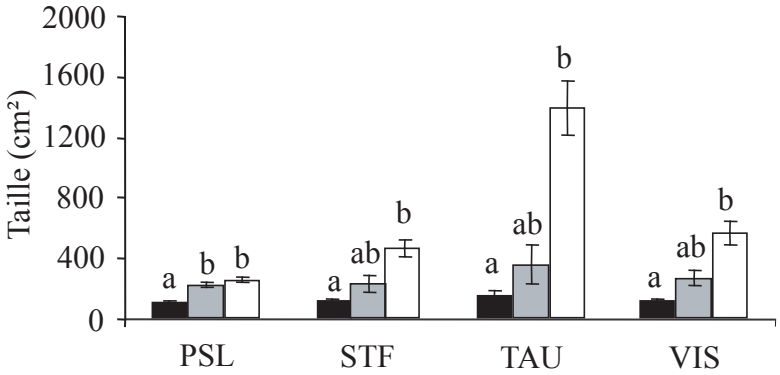


Figure 3.5. Taille moyenne (± SE) (surface foliaire en cm²) des individus de stade Végétatif 2 (noir), Avorté (gris) et Reproducteur (blanc) dans les quadrats de démographie dans chaque site (individus en milieu ouvert et fermé). Les tailles diffèrent significativement entre stades dans chaque site (PSL n=124, KW =56.89, p < 0.001 ; STF n=81, KW)=43.53, p < 0.001 ; TAU n=63, KW =28.15, p<0.001 ; VIS n=62, KW =41.48, p<0.001). Au sein de chaque site, les lettres différentes indiquent les groupes significativement différents (test de Dunn, p < 0.005).

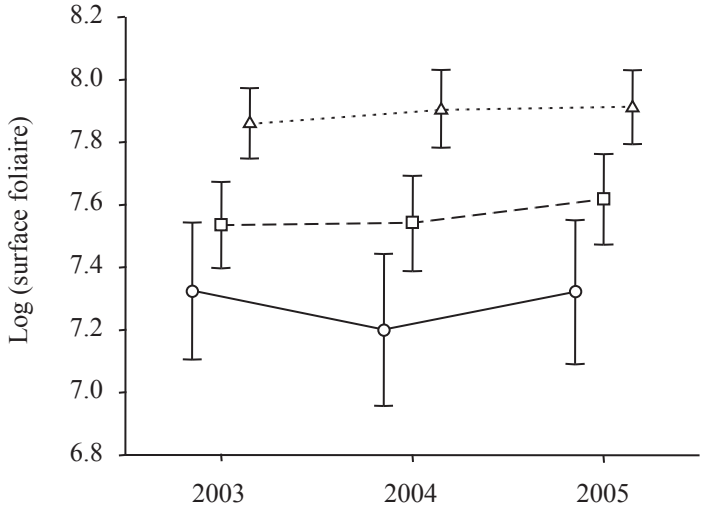


Figure 3.6. Variation de la taille des individus ayant fleuri 1 (cercles), 2 (carrés) ou 3 (triangles) fois durant l'expérimentation au Coulet. Résultats de l'ANOVA à mesures répétées: log taille = année + groupe floraison + (année x groupe floraison) : Effet groupe de floraison significatif (F2,136 = 15.4, p < 0.001) effet année non significatif (F2,272 = 2.31, p = 0.103) et interaction non significative (F4,272 = 1.29, p = 0.275)

			n	r	t(n-2)	p
Individu		carpelles	39	0.58	4.31	< 0.001*
		ovules	37	0.55	3.92	< 0.001*
		graines	38	0.62	4.75	< 0.001*
		anthères	40	0.58	4.38	< 0.001*
Tige florifère		carpelles	39	0.16	0.97	0.337
		ovules	38	0.29	1.81	0.078
		graines	38	0.40	2.65	0.012
		anthères	39	0.33	2.09	0.043
Fleur	Carpelle	ovules	38	0.29	1.81	0.079
		graines	38	0.31	1.92	0.062
	Anthère	pollen	38	0.21	1.27	0.212

Tableau 3.5. Corrélations de Spearman entre les variables de reproduction par individu, par tige ou au sein des fleurs et la taille des individus au Coulet en 2003 (données 2004 non montrées, résultats identiques). Les tests significatifs après correction de Bonferroni sont indiqués avec une étoile.

1993). Notre étude montre que chez la Pivoine officinale, trois composantes du succès reproducteur varient avec la taille des individus :

(1) La probabilité de floraison dépend de la taille des individus. Chez de nombreuses espèces pérennes il existe une taille en-dessous de laquelle la reproduction n'est pas possible (Primack et Hall 1990, Worley et Harder 1996, Pino *et al.* 2002) ce qui explique les différences de taille observées entre individus végétatifs et reproducteurs (figure 3.5). Par ailleurs, la probabilité de floraison une année donnée (l'état reproducteur ou non reproducteur d'un individu) en milieu ouvert augmente avec la taille des individus (données des quadrats de démographie en 2003, régression logistique : floraison = site + taille, effet site χ^2_3 *Wald* = 3.9, $p = 0.27$, effet taille χ^2_1 *Wald* = 60.5, $p < 0.001$). La taille des individus adultes n'ayant pas varié de façon significative sur les trois années de l'étude, une conséquence de cette relation entre probabilité de floraison et taille des individus est que la fréquence de floraison sur les trois années de l'expérimentation dépend aussi de la taille des individus (figure 3.6). Les individus reproducteurs en milieu fermé ayant une taille moindre que ceux en milieu ouvert, ceci peut expliquer la différence de probabilité de floraison détectée entre les deux types de milieu (cf. chapitre démographie).

(2) L'allocation de ressources à la reproduction est aussi dépendante de la taille des individus. Chez les plantes, les variations du nombre de fleurs par individu, de carpelles et d'anthères par fleur, du nombre de grains de pollen par anthère et d'ovules par carpelle peuvent induire des variations du succès reproducteur des individus. Chez la Pivoine officinale, le nombre de carpelles, d'ovules, de graines et d'anthères augmente avec la taille des individus (tableau 3.5). Cependant, malgré une grande variabilité du nombre d'anthères et de carpelles chez cette espèce, cette augmentation n'est pas liée à un ajustement au niveau de la tige florifère (les individus de grande taille ne produisent pas plus de graines et d'ovules par tige que les individus de petite taille), mais à une multiplication du nombre de tiges florifères (tableau 3.5). Par contre, la quantité relative de ressources allouées à la reproduction diminue avec la taille des individus : ceci indique que les individus de plus grande taille allouent une proportion moindre de biomasse à la reproduction que les individus de taille plus réduite (corrélations : taille *vs.* nombre d'ovules/taille : $r_{Sp} = -0.38$, $p = 0.020$, taille *vs.* nombre d'anthères/taille $r_{Sp} = -0.63$, $p < 0.001$). Le meilleur succès reproducteur des individus reproducteurs en milieu ouvert, détecté lors des analyses de la dynamique des populations, est donc aussi en partie lié à leur taille supérieure qui permet une production de graines plus importante.

(3) Le genre sexuel, qui est quantifié par l'allocation de ressources à la fonction femelle relativement à la fonction mâle (voir encadré "Genre sexuel"), diffère selon la taille des individus. Ainsi, les individus de plus grande taille allouent proportionnellement plus de ressources à la fonction femelle qu'à la fonction mâle, mais cette allocation différentielle n'a pu être détectée qu'après deux ans d'expérimentation. En 2003, nous n'avons pas trouvé de relation entre la taille et le genre des individus (G_o : $r_{Sp} = 0.15$, $p = 0.362$; G_s: $r_{Sp} = 0.27$, $p = 0.101$; $n = 38$). Par contre, cette relation devient significative en 2004 (G_o *:* $r_{Sp} = 0.51$, $p = 0.006$; G_s : $r_{Sp} = 0.42$, $p = 0.0247$; $n = 28$) (figure 3.7). Ceci pourrait être dû à un coût subit par les individus, soit lié à la reproduction (les individus ont été pollinisés manuellement les deux années et ont donc produit le maximum de graines possible), soit lié aux conditions météorologiques de l'été de la première

MESURE DU GENRE SEXUEL

L'allocation de ressources à la fonction femelle relativement à la fonction mâle peut être calculée à partir de la formule du genre phénotypique (Phenotypic gender) de Llyod et Bawa (1984). Le caractère femelle standardisé Gi d'un individu (standardized femaleness) est:
$G_i = d_i / (d_i + l_i.E)$ avec d_i un estimateur de l'allocation à la fonction femelle, l_i un estimateur de l'allocation à la fonction mâle et E un facteur d'équivalence tel que : $E = \Sigma d_i / \Sigma l_i$
Deux estimations du genre ont été calculées, en utilisant comme estimateur de l'allocation à la fonction mâle uniquement le nombre d'anthères (et non pas le nombre total de grains de pollen, car ce dernier à été estimé par anthère et correspond donc au nombre d'anthère multiplié par le nombre de grains de pollen par anthère) et comme estimateur de la fonction femelle le nombre de graines (G_g) ou le nombre d'ovules (G_O). Un individu se comportant uniquement en mâle à une valeur de 0, un individu se comportant uniquement en femelle à une valeur de 1.

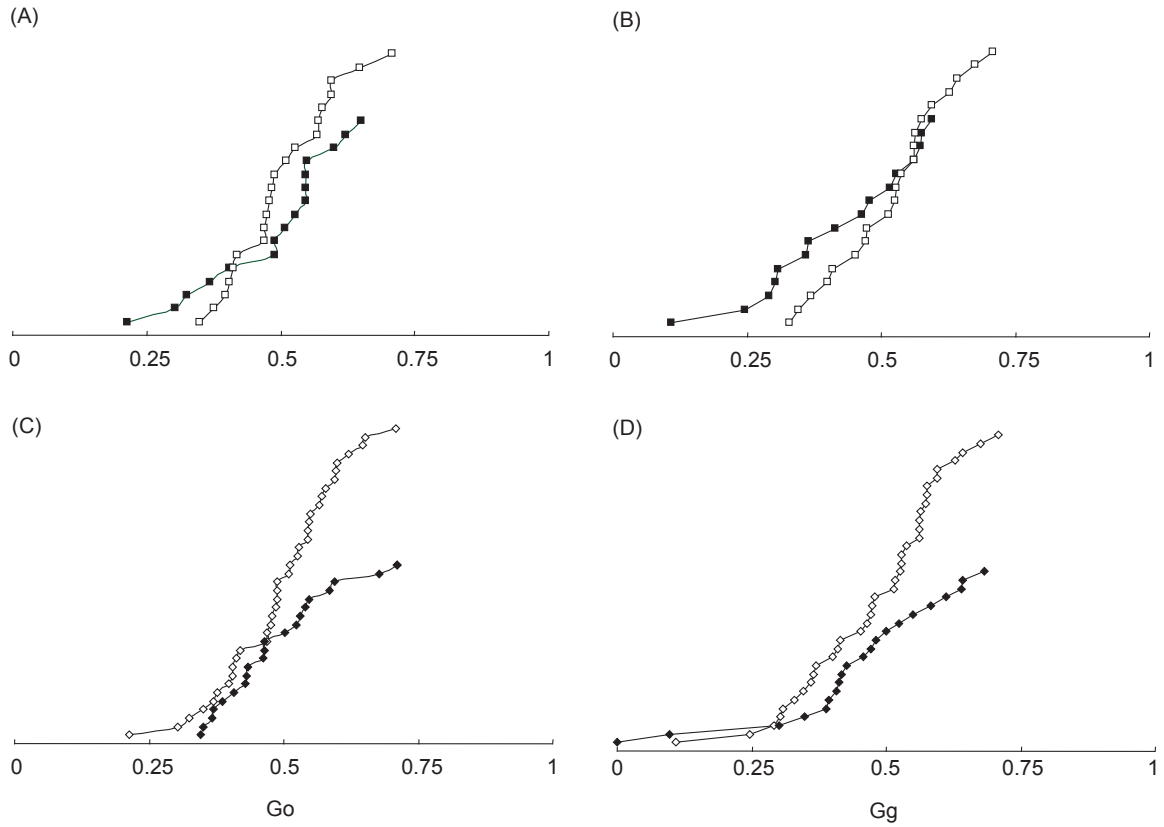


Figure 3.7. Valeurs du gender calculé à partir du nombre de d'ovules (Go) ou de graines (Gg). A, B: gender en 2003 en relation avec le devenir des individus en 2004, i.e. ceux qui fleurissent à nouveau en 2004 (blanc) et ceux qui sont devenus végétatifs en 2004 (noir). C, D: comparaison du gender des individus qui ont fleuri en 2003 (blanc) avec ceux qui ont fleuri en 2004 (noir).

année de l'expérimentation (sécheresse exceptionnelle en 2003). L'expérimentation sur les coûts à la reproduction ayant montré qu'après une production maximale de graines durant deux ans, aucun impact sur la reproduction, la croissance ou la survie n'avait été détecté, la deuxième hypothèse est la plus probable.

Chez *P. officinalis*, l'importance de la taille des individus pour les évènements de floraison et pour le succès reproducteur a donc pu en partie masquer les potentiels coûts à la reproduction. Ainsi, les plus gros individus fleurissent plus souvent et allouent une quantité absolue de ressources plus importante aux fonctions mâle et femelle. De plus, ils allouent aussi proportionnellement plus de ressources à la fonction femelle qu'à la fonction mâle car ils sont probablement plus capables de tamponner les impacts des évènements stressants (notamment les stress hydriques). Les individus les plus petits ont une probabilité de floraison plus faible et lorsqu'ils fleurissent, allouent proportionnellement plus de ressources à la fonction mâle que femelle, et ce quels que soient les évènements de reproduction passés.

Enfin, dans cette étude, le succès reproducteur des individus témoins et supplémentés en pollen a covarié les trois années, ce qui indique une variabilité temporelle de la reproduction, également observée chez d'autres espèces étudiées pendant plusieurs années (Travis 1992, Thompson et Dommée 2000). Chez les espèces végétales, il existe trois grandes stratégies de maximisation du succès reproducteur. Chez les espèces monocarpiques, la stratégie consiste à produire en une seule fois le plus grand nombre de graines possible. Chez les espèces polycarpiques, la production de graines peut se faire en masse de façon cyclique, comme c'est le cas chez certains arbres (masting) : une hypothèse est que la surproduction de fleurs permettrait d'augmenter l'efficacité de la pollinisation chez les espèces anémogames, l'autre hypothèse est que la surproduction de graines permettrait de diminuer la pression de prédation sur les graines en saturant les prédateurs (Kelly et Sork 2002, Kon *et al.* 2005). En revanche, chez beaucoup d'herbacées pérennes, la production de graines reste faible d'une année sur l'autre. Or, Travis (1992) a suggéré que chez les espèces pérennes dans un environnement variable, c'est la fréquence à laquelle une plante parvient à produire des graines (même si cette production est faible) qui est importante, plus que la quantité de graines produites ponctuellement.

Si cette hypothèse est vérifiée, une faible production annuelle de graines serait une stratégie adaptative dans des environnements imprévisibles. Ce pourrait donc être le cas de la Pivoine officinale que l'on trouve dans des paysages méditerranéens caractérisés par des dynamiques spatiales et temporelles importantes (Lepart et Debussche 1992, Thompson 2005). Une conséquence de ces productions de graines faibles serait la difficulté de détecter alors les coûts à la reproduction chez ces espèces. Une autre hypothèse est qu'une faible production annuelle de graines pourrait être une stratégie adaptative permettant de minimiser les coûts à la reproduction, ce qui expliquerait qu'ils ne sont pas détectables.

3.2 PRÉDATION ET DISSÉMINATION

3.2.1 Contexte

Chez les espèces végétales, la performance des individus dépend de leurs interactions avec les animaux, qu'elles soient mutualistes (interactions plantes-pollinisateurs - cf. chapitre 3.1.3 -, ou plantes-disséminateurs) ou antagonistes (interactions plantes-prédateurs).

Les graines sont souvent la cible des prédateurs car elles ont une valeur nutritive élevée. La prédation pré-dissémination concerne les fruits et les graines qui sont encore sur la plante, quel que soit leur degré de maturité. Elle peut limiter fortement le nombre des graines produites (Traveset 1995, Mothershead et Marquis 2000), particulièrement chez les espèces ayant une faible fécondité, comme les espèces endémiques (Lavergne *et al.* 2005). Les prédateurs peuvent aussi consommer les graines une fois au sol (prédation post-dissémination). Certaines espèces d'oiseaux (par ex. le Geai), de rongeurs (par ex. le Mulot sylvestre, l'Ecureuil) et de fourmis (par ex. le genre *Messor*) jouent le double rôle de prédatrices et de disséminatrices. Ces espèces principalement prédatrices stockent les graines pour les consommer, mais une partie échappe à la prédation pour différentes raisons et arrivent ainsi à germer (Jensen 1985, Hollander et Vander Wall 2004, Retana *et al.* 2004, Hulme et Kollmann 2005). D'autres espèces sont uniquement disséminatrices : les oiseaux de la famille des Turdidés et des Sylviidés consomment des fruits charnus et restituent leurs graines intactes et aptes à germer. La prédation peut aussi concerner le feuillage (ce type de prédation sera nommé herbivorie dans la suite du texte). La réduction de la surface photosynthétiquement active peut, en diminuant les ressources de l'individu, réduire de façon directe le taux de croissance, la fécondité ou plus rarement la survie des individus (Escarre *et al.* 1999, Horvitz et Schemske 2002, Cariveau *et al.* 2004, Hanley et May 2006). Elle peut aussi réduire de façon indirecte la fécondité, en modifiant certains traits floraux (Mothershead et Marquis 2000).

Alors que des centaines d'études traitent de l'impact des herbivores sur les performances des plantes, seules quelques unes d'entre elles ont déterminé si les effets des différents types de prédation avaient des impacts au niveau de la population, c'est-à-dire sur leur dynamique (Bastrenta *et al.* 1995, Maron et Gardner 2000, Garcia et Ehrlen 2002). De même, les réductions de la fécondité dues à la prédation, quelle que soit leur intensité, n'affectent pas automatiquement la dynamique de la population (Ehrlen 1996) : elles devraient pour cela conduire à une limitation du recrutement, or ce point est rarement étudié (Louda et Potvin 1995, Maron et Gardner 2000). L'action conjointe des mutualistes et des antagonistes peut avoir non seulement un impact sur l'écologie de la reproduction, mais aussi sur l'évolution des traits liés à la reproduction (Thompson 2005). Les pressions de sélection induites par les prédateurs et les pollinisateurs peuvent ainsi agir de façon opposée sur les mêmes traits, par exemple sur des traits liés à l'attractivité (Fenner *et al.* 2002). Elles peuvent aussi conduire à des associations entre les traits sélectionnés par les antagonistes et ceux sélectionnés par les mutualistes, s'il existe une non-additivité de leurs effets sur la fitness (Herrera 2000, Herrera *et al.* 2002). Le même raisonnement peut être tenu sur les relations entre prédateurs des graines et disséminateurs.

Que ce soit au niveau des structures reproductives ou du feuillage, les taux de prédation présentent une grande variabilité, dépendant d'interactions complexes mettant en jeu de nombreux facteurs. La sévérité de l'impact d'un évènement de prédation dépend de l'importance de l'organe touché (dans l'acquisition de la biomasse, dans la reproduction ou dans la survie), du moment de la prédation et de la quantité de matière prélevée par rapport à la biomasse de l'individu (et donc des caractéristiques biologiques du prédateur), et des caractéristiques de l'individu comme son état physiologique (stress), sa qualité génétique et ses défenses physiques et chimiques (Harper 1977, Crawley 1983). Ainsi, le niveau de stress subi par les individus (induit par des conditions climatiques particulièrement sévères une année donnée, ou lié à un habitat peu favorable) peut influencer leur sensibilité à la prédation. Une première hypothèse suppose que les individus en condition de stress sont plus attaqués par les prédateurs, le stress induisant des modifications physiologiques à l'origine notament d'une augmentation dans la sève de l'azote assimilable par les prédateurs (White 1984, Larsson 1989). La seconde hypothèse est basée sur le fait que les individus en condition de stress peuvent augmenter leurs défenses physiques ou chimiques, et sont donc moins attaqués (Agrawal 1998). La relation entre stress et prédation est donc complexe et fortement dépendante des guildes de prédateurs considérées et du type de stress (Koricheva *et al.* 1998). Par ailleurs, le niveau des défenses chimiques ou physiques et la tolérance à la prédation peuvent varier de façon non linéaire en fonction de l'âge ou du stade des individus (Boege et Marquis 2005). Il est donc nécessaire de mener des études basées sur la prise en compte de plusieurs stades de développement (Warner et Cushman 2002) et non simplement sur des comparaisons entre deux stades (e.g. Kearsley et Whitham 1989, Fenner *et al.* 1999, Fritz *et al.* 2001) pour pouvoir estimer les conséquences démographiques de la prédation.

Les taux de prédation et d'herbivorie ont une forte hétérogénéité spatio-temporelle (e.g. (Traveset 1995, Ehrlen 1996, Sperens 1997, Ehrlen 2002, Leimu *et al.* 2002, Ostergard et Ehrlen 2005) car les interactions plantes/animaux varient dans le temps (Crawley 1983) et dans l'espace (Gomez et Zamora 2000, Hulme et Kollmann 2005, Thompson 2005). Ainsi, l'identité et l'abondance des prédateurs présentent une variabilité spatiale, qui dépend de leurs préférences pour certains types d'habitat, de la structuration spatiale des populations végétales et de la composition floristique (Root 1973, Janzen 1975, Leimu *et al.* 2002, Prieur-Richard *et al.* 2002). La variabilité spatiale de la prédation peut aussi être différente selon que les prédateurs soient des spécialistes ou des généralistes (Ostergard et Ehrlen 2005). Il existe cependant peu d'études mettant en relation la variabilité spatio-temporelle de la prédation avec des caractéristiques de l'habitat (Janzen 1975, Escarre *et al.* 1999, Forget *et al.* 1999).

L'hétérogenéité spatio-temporelle de la mosaïque d'habitats joue aussi un rôle majeur dans le patron de dissémination des graines. Celle-ci peut induire des variations dans trois composantes de la dissémination : le nombre de graines disséminées, la distance de dissémination et le milieu de dépôt des graines. Le type d'habitat peut avoir un impact sur la production de graines et donc sur le nombre de graines pouvant être disséminées : chez *P.officinalis*, la fermeture forestière a un fort impact négatif sur la production de graines. Ensuite, la variabilité de la mosaïque d'habitats peut affecter la composition du cortège d'espèces disséminatrices et prédatrices ainsi que leur abondance, ce qui a des

impacts sur les trois composantes de la dissémination (Hulme 1997, Hulme 1998, Russell et Schupp 1998, Wolff et Debussche 1999) : (1) la proportion du nombre de graines disséminées par rapport au nombre de graines consommées diffère selon le type de disséminateur, selon le comportement des agents disséminateurs, les propagules peuvent (2) être disséminées préférentiellement vers un certain type de milieu, qu'il soit favorable ou non à l'installation (Debussche et Isenmann 1994, Hulme 1997, Russell et Schupp 1998, Alcantara *et al.* 2000), ou (3) être disséminées à plus ou moins grande distance et donc influencer la dynamique des populations ou des métapopulations végétales (Johst *et al.* 2002, Levin *et al.* 2003, Hulme et Kollmann 2005). En effet, la dissémination à courte distance a des conséquences locales sur les flux de gènes (apparentement, système d'auto-incompatibilité) et sur la densité des individus (densité-dépendance de la prédation, compétition) (Kalisz *et al.* 1999, Harms *et al.* 2000). De plus, la dissémination à longue distance joue un rôle dans les processus de colonisation de nouveaux sites et dans les flux de gènes entre populations.

La connaissance des capacités de dissémination en fonction de l'hétérogénéité spatio-temporelle de l'habitat est donc essentielle pour comprendre le fonctionnement des populations, et particulièrement lorsque celles-ci sont soumises à des modifications importantes et rapides de l'habitat. Malheureusement, les rares évènements de dissémination à longue distance (Nathan *et al.* 2003) sont difficiles à détecter et à étudier malgré leur importance (Portnoy et Willson 1993, Cain *et al.* 1998), et la relation entre les agents responsables de la dissémination à longue distance et le syndrome de dissémination (par ex. la morphologie des diaspores) est faible (Portnoy et Willson 1993, Higgins *et al.* 2003).

L'objectif de ce chapitre est de répondre aux questions suivantes : la fermeture forestière a –t'elle un impact sur les interactions entre la Pivoine officinale et a) les prédateurs de ses graines avant et après dissémination, ce qui est rarement étudié pour une même plante (Hulme 2002) ? b) sur les intéractions avec les disséminateurs ? et c) sur les intéractions avec les prédateurs des parties végétatives ? Enfin, est-ce que ces interactions ont un impact sur la dynamique des populations de l'espèce ?

3.2.2 Prédation des graines non mûres

Méthodologie et résultats

Les objectifs sont ici (1) de déterminer s'il existe une variabilité spatio-temporelle des taux de prédation pré-dissémination, et plus précisément s'ils diffèrent entre milieux ouvert et fermé et (2) d'estimer si ces taux de prédations peuvent avoir un effet sensible sur la dynamique des populations de Pivoines. Pour cela, l'étude de la prédation pré-dissémination a été basée sur des observations de terrain.

Les évènements de prédation des follicules des individus dans les quadrats de démographie ont été suivis de 2003 à 2005. Un follicule a été considéré comme endommagé si au moins une de ses graines a été détruite (les follicules présentent souvent des signes de prédation mais sans que les graines aient été elles-mêmes détruites, ce qui n'a donc aucun impact sur le succès reproducteur

site	milieu	2003 n	2003 tiges florifères	2003 % tiges prédatées	2004 n	2004 tiges florifères	2004 % tiges prédatées	2005 n	2005 tiges florifères	2005 % tiges prédatées
PSL	ouvert	26	26	0.0	10	10	10.0	15	15	13.3
	fermé	3	3	0.0	1	1	0.0	2	2	0.0
	total	29	29	0.0	11	11	9.1	17	17	11.8
STF	ouvert	38	49	18.4	29	46	26.1	19	26	0.0
	fermé	12	12	16.7	14	14	0.0	3	4	0.0
	total	50	61	18.0	43	60	20.0	22	30	0.0
TAU	ouvert	47	139	23.0	55	216	26.4	54	174	21.3
	fermé	13	17	5.9	11	11	0.0	5	6	16.7
	total	60	156	21.2	66	227	25.1	59	180	21.1
VIS	ouvert	28	39	2.6	26	36	8.3	25	38	13.2
	fermé	26	27	7.4	23	24	0.0	27	29	0.0
	total	54	66	4.5	49	60	5.0	52	67	7.5

Tableau 3.6. Récapitulatif des nombres d'individus, de tiges florifères et des taux de prédation pour chaque site, milieu et année.

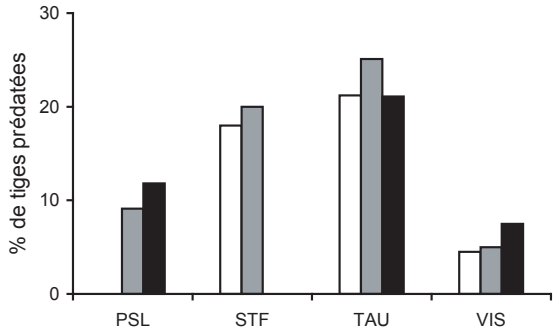


Figure 3.8 Pourcentage de tiges florifères attaquées sur chaque site (milieux ouvert et fermé confondus) en 2003 (blanc), 2003 (gris) et 2004 (noir).

des individus). Cependant, lorsque la totalité des follicules d'une tige florifère a été consommée, il est souvent impossible de déterminer avec certitude le nombre de carpelles et donc de calculer la proportion de follicules consommés par individu. Comme par ailleurs la production de graines dépend fortement du nombre de tiges florifères chez *P. officinalis*, le pourcentage de prédation dans chaque population n'a pas été calculé par individu mais par tige florifère (nombre de tiges florifères dont au moins un follicule a été endommagé par rapport au nombre total de tiges florifères). La proportion de tiges dont au moins un follicule a été endommagé (avec au moins une graine détruite) a été comparée entre sites, années et milieux grâce à des tests de χ^2. Les individus ne fleurissant pas chaque année et les taux de prédation étant faibles, il n'a pas été possible d'analyser si ce sont les mêmes individus ou les mêmes quadrats qui ont subi l'impact de prédateurs systématiquement chaque année ou non. Afin de déterminer si la densité en tiges florifères avait une influence sur le taux de prédation, des corrélations entre nombre de tiges florifères et taux de prédation par quadrat ont été réalisées dans chaque habitat pour chaque année et chaque milieu lorsque les effectifs le permettaient. La faune responsable de ces prédations n'a pas fait l'objet d'une étude spécifique.

Les taux de prédations sont faibles : pour chacune des trois années de suivi et pour chacun des quatre sites d'étude, la proportion de tiges florifères ayant subi l'impact de prédateurs est au maximum de 26 % (tableau 3.6), ce qui correspond à une réduction du nombre de graines bien inférieur, car dans la grande majorité des cas les prédations ne concernent qu'un seul follicule par tige florifère et un petit nombre de graines par follicule. La proportion de tiges endommagées diffère entre sites les trois années de suivi (2003 : $\chi^2_3 = 15.79$, $p = 0.001$, 2004 : $\chi^2_3 = 12.74$, $p = 0.005$, 2005 : $\chi^2_3 = 13.44$, $p = 0.004$), les taux de prédations étant élevés à TAU et faibles à VIS les trois années, faibles au PSL en 2003 et faibles à STF en 2004 (tableau 3.6, figure 3.8). Au sein de chaque site, il n'y a pas de variations inter-annuelles des taux de prédations à PSL ($\chi^2_2 = 3.38$, $p = 0.185$), TAU ($\chi^2_2 = 1.22$, $p = 0.543$) et VIS ($\chi^2_2 = 0.61$, $p = 0.739$), mais à STF, la prédation a été plus faible en 2005 ($\chi^2_2 = 6.82$, $p = 0.033$) (tableau 3.6, figure 3.8). Les taux de prédation en milieux ouvert et fermé au sein de chaque station et pour chaque année sont soit plus faibles en milieu fermé (STF 2004 : $\chi^2_1 = 4.57$, $p = 0.033$; TAU 2004 : $\chi^2_1 = 3.38$, $p = 0.049$; VIS 2005 : $\chi^2_1 = 4.12$, $p = 0.042$), soit non significativement différents. Il semble pourtant y avoir une tendance à une prédation plus faible en milieu fermé, les pourcentages de prédation étant systématiquement inférieurs en milieu fermé qu'en milieu ouvert à l'exception d'un site pour une année (VIS 2003), et plus souvent nuls qu'en milieu ouvert (tableau 3.6). Aucune corrélation significative entre le nombre de tiges florifères par quadrat (et donc la densité) et le taux de prédation n'a été détectée sur les trois années de l'expérimentation au sein de chaque milieu dans chaque site.

Une faible prédation des graines non mûres

A VIS, PSL et STF, les taux de prédation sont très faibles et la majorité des traces de prédation correspondent à celles d'invertébrés : des observations directes d'Orthoptères (Tettigoniidae) consommant les follicules ont été faites à plusieurs reprises, ainsi que quelques observations de chenilles de Lépidoptères forant les boutons floraux ou consommant boutons et jeunes feuilles

lors de l'émergence des individus, de façon similaire à ce qui a été observé pour *P. Broteroi*, une autre espèce de Pivoine méditerranéenne (Sanchez-Lafuente *et al.* 1999, Sanchez-Lafuente 2002). De plus, des observations de traces de rongeurs sur les follicules avant leur déhiscence, rares mais non ambigües, ont été faites durant les suivis. Il faut remarquer que le site de TAU diffère fortement des autres : les taux de prédation en milieu ouvert y sont particulièrement élevés et correspondent à une prédation totale des follicules et donc des graines par des Ongulés sauvages (coupures nettes et franches de l'extrêmité des tiges florifères, abroutissement de pousses ligneuses, nombrex feces sur les quadrats et à proximité immédiate). Cette prédation par des Ongulés sauvages est aussi observée chez *P. broteroi* (Herrera 2000). Il semble que ceux-ci prélèvent en fait les boutons floraux ou les follicules en début de formation : les dégâts sont déjà observables au mois de juin (au moment des suivis démographiques), et il n'y a pas de dégâts supplémentaires jusqu'à la fin du mois de juillet (au moment des relevés sur la reproduction).

Le fait que les prédateurs ne semblent pas répondre à la densité de tiges florifères au sein de chaque site et milieu suggère que les différences de taux de prédation entre milieux ouvert et fermé sont plutôt liées à l'habitat. Ceci est cohérent d'une part avec une prédation principalement réalisée par des Orthoptères, qui sont plus fréquents dans les milieux ouverts, et d'autre part avec une prédation principalement liée à des espèces généralistes et non spécialistes (Ostergard et Ehrlen 2005).

Les conséquences démographiques de la prédation pré-dissémination ont rarement été étudiées (e.g. Bastrenta *et al.* 1995, Garcia et Ehrlen 2002, Szentesi et Jermy 2003), alors que les connaissances sur les taux de prédation des graines ne suffisent pas à extrapoler leur impact sur la dynamique des populations, en particulier chez les plantes polycarpiques à durée de vie longue. La comparaison de la dynamique des individus subissant une forte *vs.* faible prédation (Ehrlen 1996) ne peut être envisagée ici, car les taux de prédation et les effectifs de reproducteurs sont trop réduits. On peut cependant avoir des indices de l'impact de la prédation sur la dynamique de façon indirecte. En effet, les conséquences démographiques d'une diminution du nombre de graines sont liées à la sensibilité de la population à cette diminution, à la présence ou non d'une banque de graines et au fait que la population peut être limitée par son nombre de graines plutôt que par la disponibilité en sites favorables à la germination (Harper 1977, Maron et Gardner 2000, Szentesi et Jermy 2003). Les caractéristiques de la banque de graines de *P. officinalis* ne sont pas encore connues. Par contre, il semble qu'il n'existe pas une limitation du nombre de microsites favorables à la germination dans les populations étudiées : en effet, dans la grande majorité des placettes de semis placées au sein des populations, une partie des graines a germé (dans 40 sur 42 placettes) et une partie des plantules a survécu (dans 38 sur 40 placettes). Ceci suggère que le nombre de plantules est plus vraisemblablement limité par le nombre de graines disponibles et / ou par leur faible dissémination (cf. chapitre sur la dissémination), mais il faut attendre que ces plantules atteignent le stade reproducteur pour le confirmer.

Enfin, la sensibilité des populations à la réduction du nombre de graines peut être évaluée à partir des analyses d'élasticité effectuées à partir des modèles matriciels de dynamique des populations (cf. chapitre dynamique des populations). En effet, le taux d'accroissement asymptotique d'une

population étant un index intégrant les différents paramètres démographiques (survie, croissance et reproduction), son élasticité *e* à la variation des paramètres de fécondité permet d'évaluer les conséquences démographiques d'une variation du nombre de graines. Or, les élasticités du taux d'accroissement des populations à la fécondité sont faibles dans les milieux et sites dont le taux d'accroissement est inférieur à 1 (e = 0.0022 – 0.0760), alors que les élasticités sont plus élevées dans ceux dont le taux d'accroissement est supérieur ou égal à 1 (e = 0.1175 – 0.2680). La prédation des graines, à des intensités comme celles observées dans cette étude, n'est donc pas susceptible de réduire de façon significative le taux d'accroissement des populations qui sont déjà en décroissance, et elle n'est pas suffisante pour menacer les populations en croissance. Par contre, pour la population dont le taux d'accroissement n'est pas significativement différent de 1 (STF en milieu ouvert), les variations inter-annuelles de l'intensité de la prédation sont susceptibles de la placer en décroissance certaines années (Ehrlen 1996).

Dans les populations étudiées, la prédation des graines avant leur maturité par les invertébrés et les rongeurs ne semble représenter ni une forte pression de sélection, ni un fort impact négatif sur le succès reproducteur des individus et sur la dynamique des populations. de plus, la prédation des follicules ne semble pas être un facteur aggravant de la faible fécondité des individus en milieu fermé. Cependant, la forte prédation des boutons floraux ou des follicules par les ongulés et la forte sensibilité à des variations de fécondité de la population de TAU en milieu ouvert indique que, dans les populations présentant une très forte fécondité dans des sites de forte densité en ongulés sauvages ou en bétail, le succès reproducteur et la dynamique des populations pourraient être affectés (Sanchez-Lafuente 2002). Ceci est à confirmer et à prendre en considération si une gestion du milieu par pâturage doit être envisagée (e.g. Bastrenta *et al.* 1995).

3.2.3 Prédation et dissémination des graines mûres

Méthodologie et résultats

L'étude de la dissémination des graines d'une espèce est difficile à mettre en oeuvre, mais deux types d'approches peuvent néanmoins être utilisées (Wang et Smith 2002). Les études directes consistent à suivre le devenir de la graine de la plante jusqu'à son site de dépôt grâce à des marquages (Kalisz *et al.* 1999, Wang et Smith 2002) ou des captures de graines (Weiblen et Thomson 1995, Harms *et al.* 2000). Le principal inconvénient de ces méthodes est qu'elles nécessitent un nombre de diaspores disséminées important ; ces méthodes ne peuvent donc pas être utilisées pour les espèces produisant peu de graines ou dont les évènements de dissémination sont rares, comme c'est le cas chez *P. officinalis*. Certaines méthodes indirectes consistent à étudier ce qui résulte de la dissémination, c'est à dire la distribution spatiale des plantules (Colas *et al.* 1997) ou la structuration génétique dans la population (Petit *et al.* 1997, Cain *et al.* 2000, Fréville *et al.* 2001). Cependant, ceci ne donne accès qu'à une partie des graines disséminées puisque les processus post-dissémination ont déjà eu lieu (Nathan et Muller-Landau 2000). D'autres méthodes indirectes consistent à inférer le patron spatial de dissémination à partir de la connaissance du comportement des disséminateurs par des observations directes (Herrera et Jordano 1981, Vellend *et al.* 2003) ou à partir d'expérimentations

ORNITHOCHORIE ET MIMETISME

Certains traits de la Pivoine officinale sont caractéristiques des espèces ornithochores (Pijl, 1972) : (a) ses graines sont enrobées d'un tégument charnu comestible, (b) ses graines sont protégées avant la maturité par des carpelles verts et épais, (c) ses graines ont un tégument solide qui les protège lors de la digestion par les disséminateurs, (d) à maturité les diaspores sont accessibles et restent bien visibles sur la plante pendant une longue période, (e) leur tégument charnu noir, contraste avec l'intérieur rouge des follicules et avec les ovules non fertilisés rouges eux aussi; ces couleurs et contrastes sont attractifs pour les oiseaux.

Cependant, certaines caractéristiques font de la Pivoine officinale une espèce marginale au sein des espèces à fruits charnus ornithochores et qui fructifient simultanément dans la région d'étude (ces caractéristiques sont détaillées dans l'article de l'annexe xxx): (a) le tégument charnu est de faible épaisseur, de valeur nutritive très réduite, et il se dessèche en quelques jours, (b) le contraste des couleurs noir/rouge se ternit rapidement (c), la morphologie de la plante (tiges herbacées érigées, follicules dirigés vers le haut) est partagée par très peu de plantes à fruits charnus et rend probablement l'accès aux diaspores difficile pour les oiseaux.

Le rôle peu important des oiseaux dans la dissémination de P. officinalis n'était pas attendu. Le fait que plusieurs espèces de Pivoines aient des traits typiques du syndrome d'ornithochorie, tout en n'investissant que très peu dans la pulpe des diaspores, fait penser à du mimétisme, et certains auteurs les classent en effet comme espèces mimétiques, mais sans l'appui d'observations ou d'expérimentations (Pijl, 1972; (Galetti 2002). Ce type de mimétisme est basé sur la confusion que peuvent faire les oiseaux entre des fruits charnus et des diaspores mimant des fruits charnus (Ridley 1930; Pijl 1972; Schaefer et al. 2004) et nécessite donc que l'espèce mimétique soit mélangée à des espèces à fruits charnus et qu'elle soit peu fréquente (Peres & vanRoosmalen 1996; Foster & Delay 1998; Galetti 2002). C'est le cas de P. officinalis sur les sites d'étude (en mélange avec Amelanchier ovalis, Cornus sanguinea, Daphne laureola, Prunus mahaleb et Rubia peregrina, qui portent des fruits de taille et couleur semblable). Dans le genre Paeonia, la morphologie des graines couvre un gradient allant de petites diaspores noires contrastant fortement avec le rouge des ovules non fertilisés et des follicules (groupe de P. mascula, (Sang et al. 1997; Halda & Waddick 2004)), à des graines plus grosses contrastant moins avec les follicules (P. officinalis), jusqu'à des graines grosses (1,3 cm de diamètre) et marron (Hong 1997). Ce gradient morphologique suggère des assemblages de disséminateurs différents pour ces groupes d'espèces phylogénétiquement différents mais ayant des habitats similaires (Halda and Waddick, 2004) et des aires de distributions semblables (Sang et al., 1997). Les traits actuels des diaspores pourraient être maintenus par des contraintes historiques et phylogénétiques, et ainsi illustrer le découplage entre l'origine et la maintenance de ces traits (Jordano, 1995).

d'offres sélectives de graines (Kelrick *et al.* 1986, Weiblen et Thomson 1995, Hulme 1997). L'inférence du patron de dissémination des graines à partir du comportement des disséminateurs (Vellend *et al.* 2003, Hulme et Kollmann 2005) pose deux types de problèmes : d'une part celui de l'interprétation, et d'autre part le fait que les animaux identifiés par les offres sélectives de graines ne sont que les disséminateurs potentiels, le devenir même de la graine (détruite ou disséminée) n'étant pas connu.

L'objectif est ici de déterminer le patron de dissémination des graines de *P. officinalis*, qui n'était pas documenté, et ce en relation avec l'habitat. Les différentes contraintes du modèle d'étude et de la mise en œuvre des expérimentations nous ont donc amené à utiliser plusieurs méthodes indirectes basées (1) sur les taux de prélèvement des graines, grâce à une expérimentation d'offre de graines avec exclusions sélectives des disséminateurs et prédateurs potentiels, et une autre expérimentation permettant de déterminer le taux de prélèvement des graines sur les plantes (cf annexe 2.4), et (2) sur l'observation de la distribution des plantules autour des plantes mères (cf annexe 2.1) et l'observation des évènements de colonisation dans les placettes de semis. Le détail des analyses et protocoles se trouve en annexe 2.4.

La première expérimentation a consisté à déterminer le taux de prélèvement des graines directement sur les plantes, en milieu fermé et en milieu ouvert, en comparant le taux de chute des graines d'individus dont les follicules ont été protégés par des sacs en tissus, au taux de disparition des graines d'individus témoins non protégés. La différence entre ces deux taux correspond donc à la part des graines ayant été prélevée par des disséminateurs ou des prédateurs. Compte tenu du faible nombre d'individus reproducteurs disponibles, cette expérimentation n'a pu être menée qu'à VIS (2004).

Afin de déterminer quels étaient les animaux pouvant prélever les graines de Pivoines dans chaque type de milieu, une expérimentation d'offre de graines a été mise en place en 2004 à STF etVIS (voir Kelrick *et al.* (1986) pour les hypothèses liées à cette technique). Elle a consisté à mettre des graines à disposition des trois types de disséminateurs les plus communs dans la région d'étude (fourmis, rongeurs et oiseaux) (Hulme et Benkman 2002), grâce à des exclusions sélectives :

- soit au niveau du sol afin de mimer le prélèvement des graines tombées au sol (4 traitements : graines inaccessibles 1) à tous (témoin), 2) aux oiseaux et rongeurs, 3) aux oiseaux, et 4) graines accessibles à tous) (e.g. Parmenter *et al.* 1984, Hulme 1997)

- soit en hauteur afin de mimer le prélèvement des graines directement sur les follicules (4 traitements : graines inaccessibles 1) à tous (témoin), 2) aux oiseaux et rongeurs, 3) aux rongeurs et fourmis, 4) aux oiseaux) (e.g. Kollmann *et al.* 1998, Castro *et al.* 1999).

Le choix des trois types de disséminateurs potentiels a été motivé par plusieurs observations : (1) des fourmis (M*essor sp.*) sont capables de transporter les graines de Pivoines présentées sur leur trajet, (2) des restes de graines sont observés, à deux reprises, à la sortie d'un terrier de rongeur et des follicules sont rongés par des rongeurs avant leur déhiscence avec des graines consommées, et (3) la Pivoine présente un syndrome d'ornithochorie (Encadré). Pour ces deux expérimentations, les données ont été analysées grâce à des modèles de survie de Cox. Afin d'évaluer la distance

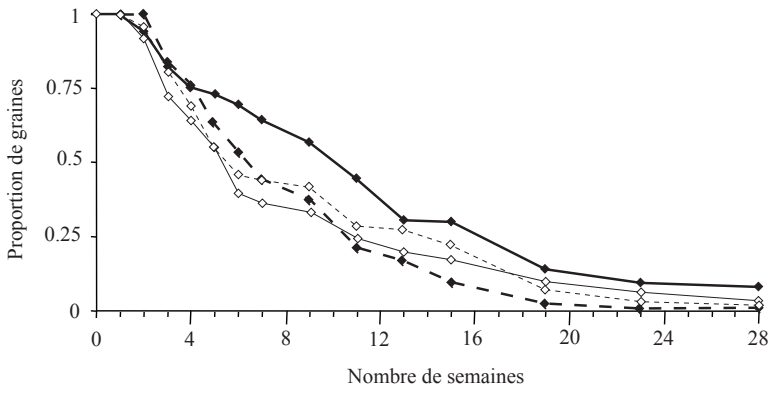


Figure 3.9. Diminution de la proportion de graines restant sur les carpelles au cours du temps à Vissec, en milieu ouvert (lignes fines) et en milieu fermé (lignes épaisses) pour les individus témoins (pointillés) et ensachés (lignes pleines). Les modèles de survie mettent en évidence qu'il n'y a pas de différence de taux de chûte des graines entre les deux traitements en milieu ouvert ($\beta = 0.26 \pm 0.35$, $X^2 1 = 0.53$, $p = 0.466$), mais que ce taux diffère en milieu fermé ($\beta = 0.80 \pm 0.32$, $X^2 1 = 6.39$, $p = 0.011$) avec un taux de disparition des graines 2,25 fois plus élevés pour les individus témoins que pour les individus ensachés (hazard ratio = 2.25, I.C. 95% : 1.20-4.21).

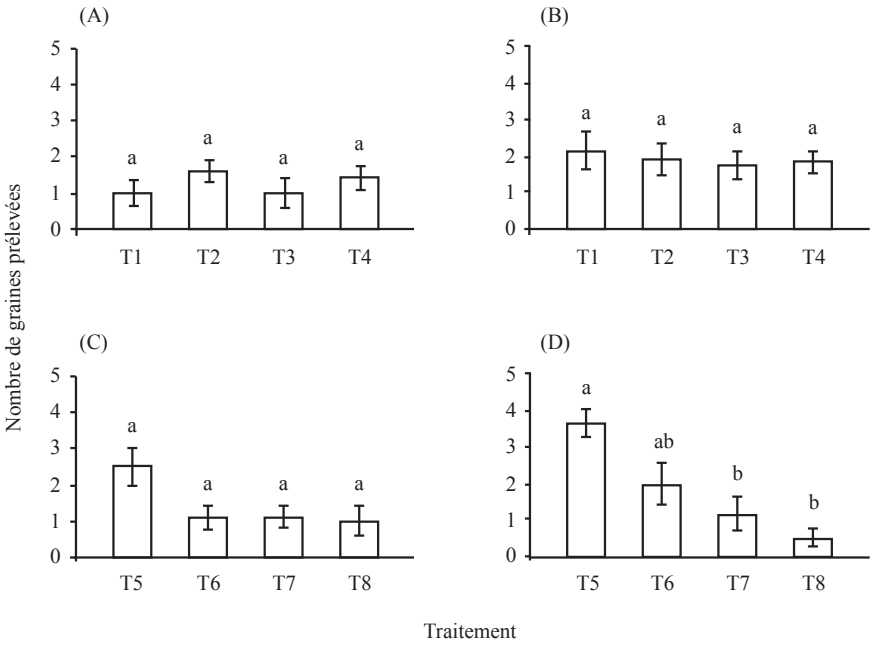


Figure 3.10. Comparaison du nombre moyen de graines ayant disparu des dispositifs (± SE) à la fin de l'expérimentation d'offres de graines, par traitement et par milieu, par des tests de Kruskal Wallis (n = 12). Dispositifs en hauteur : T1 = inaccessible aux rongeurs et fourmis, T2 = inaccessible aux oiseaux, T3 = inaccessible aux oiseaux et rongeurs, T4 = inaccessible à tous. Dispositifs au sol : T5 = accessible à tous, T6 = inaccessible aux oiseaux, T7 = inaccessible aux oiseaux et rongeurs, T8 = inaccessible à tous. (A) dispositifs en hauteur en milieu ouvert, KW = 4.1434, p = 0.246 ; (B) dispositifs en hauteur en milieu fermé, KW = 0.3325, p = 0.954 ; (C) dispositifs au sol en milieu ouvert, KW = 6.8699, p = 0.076 ; (D) dispositifs au sol en milieu fermé, KW = 18.7352, $p < 0.001$. Les lettres codent pour les traitements significativement différents après comparaison multiple (Dunn $p < 0.05$).

de dissémination des graines, des individus florifères isolés (i.e. a plus de 2 m d'un autre individu florifère pour éviter une superposition trop importante des pluies de graines de chaque individu) ont été repérés et les plantules présentes dans un rayon de 1.5 m ont été cartographiées (PSL, 2002). Par ailleurs, les placettes de semis mises en place en 2003 dans chaque site et chaque milieu ont permis de mettre en évidence des évènements de colonisation à courte distance grâce au quadrat témoin 'vide'.

L'expérimentation d'offre de graines mimant le prélèvement des graines directement sur la plante ne met en évidence aucun prélèvement significatif (cf. annexe 2.4). Alors que l'expérimentation d'ensachage des follicules ne met en évidence aucun prélèvement significatif en milieu ouvert, les graines en milieu fermé ont disparu des follicules des individus témoins à un taux 2,25 fois plus important que le taux de chute des graines des individus ensachés (figure 3.9). Les résultats différents obtenus en milieu fermé par les deux expérimentations pourraient être dûs soit à une attractivité moindre des graines lorsqu'elles sont dans le dispositif par rapport à celles exposées sur les follicules, soit à la différence de durée d'exposition des graines entre les deux expérimentations, soit au fait qu'en conditions naturelles le prélèvement d'une graine sur un follicule provoque la chute de plusieurs autres graines par simple contact. Dans ce dernier cas, le taux de prélèvement sur les follicules pourrait être surestimé.

L'analyse du modèle de survie prenant en compte les effets Traitement, Milieu et leur interaction, a permis de déterminer quels types de disséminateurs potentiels prélevaient des graines de façon significative (cf. annexe 2.4). Les fourmis n'interviennent pas dans la dissémination. Par contre, les taux de prélèvement des graines dans les traitements laissant les graines accessibles à tout type de disséminateurs et inaccessibles aux oiseaux ont été significativement plus importants que celui du traitement " témoin ", et le taux de prélèvement des graines du traitement " accessible à tous " a été significativement plus important que celui dont les graines étaient inaccessibles aux oiseaux. Ceci est confirmé par les différences de nombre de graines prélevées à la fin de l'expérimentation dans chaque traitement (figure 3.10). Une fois les graines au sol, le taux de prélèvement a été 1,4 fois plus important en milieu fermé qu'en milieu ouvert tout en étant très faible dans ce dernier, puisqu'après 1,5 mois d'exposition des graines, il n'y avait pas de différence de nombre de graines prélevées entre les traitements (figure 3.10).

Une dissémination spatialement limitée

Les taux de prélèvement des graines sont d'une part très faibles (une partie des graines peut rester sur les plantes-mères jusqu'au moins de janvier, soit six mois après la déhiscence des follicules) et d'autre part diffèrent entre milieu ouvert et milieu fermé. La plus forte prédation en milieu fermé est cohérente avec les connaissances sur le comportement des rongeurs (Hulme 1997, Hulme 1998) et des oiseaux frugivores disséminateurs (Herrera et Jordano 1981, Izhaki *et al.* 1991, Alcantara *et al.* 2000) qui ne recherchent pas leur nourriture en habitat ouvert. Le mode de dissémination principal de la Pivoine en milieu ouvert semble être la barochorie, c'est-à-dire la simple chute au sol par gravité des graines, à proximité de la plante mère (Molinier et Müller 1938, Pijl 1972). Ceci est

	VIS		STF	
	ouvert	fermé	ouvert	fermé
Disséminateurs	*Erithacus rubecula* *Turdus merula* *Turdus philomelos* *(Sylvia undata)*	*Erithacus rubecula* *Sylvia atricapilla* *Turdus merula* *Turdus philomelos* *(Ficedula hypoleuca)*	*Erithacus rubecula* *Sylvia atricapilla* *Turdus merula*	*Erithacus rubecula* *Sylvia atricapilla* *Turdus merula* *(Sylvia cantillans)*
Prédateurs	*Parus major*	*Parus coeruleus* *Parus major* *(Fringilla coelebs)*	*Parus major*	*Parus coeruleus* *Parus major*

Tableau 3.7. Espèces d'oiseaux disséminatrices ou prédatrices des graines de plantes à fruits charnus dans la région d'étude, recensées au moment de la maturité des graines de pivoines dans chaque type de milieu sur les sites de VIS et STF (mi-Juillet à mi-Août 2003 et 2004). Les espèces entre parenthèses correspondent soit à des espèces pour lesquelles les graines de Pivoines sont à la limite supérieure de la taille des graines qu'elles peuvent ingérer (Debussche and Isenmann, 1989), soit à des espèces occasionnelles sur les sites.

d'ailleurs confirmé par la distribution spatiale des plantules en milieu ouvert : elles sont agrégées sous la plante mère, dans le sens de la pente (80 % des plantules se trouvent à une distance de la plante-mère inférieure à 0.8 m) (Andrieu *et al.* 2006). De plus, sur les 42 placettes expérimentales placées dans les populations mais à au moins 2 m de l'individu reproducteur le plus proche, un seul évènement de colonisation a été observé en deux ans.

L'expérimentation d'offres de graines permet de conclure au rôle important des rongeurs en milieu fermé et est confirmée par les indices sur le terrain. Le Mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*), qui est l'espèce la plus commune dans la région d'étude (Orsini 1979) et dont le régime alimentaire est principalement composé de graines (Butet et Paillat 1997), est probablement l'espèce en cause. Les différences de prélèvement entre les traitements dont les graines sont accessibles à tous et ceux inaccessibles aux oiseaux pourraient être imputables aux oiseaux mais aussi aux sangliers. Six espèces d'oiseaux pouvant collecter les graines de pivoines soit au sol, soit sur les follicules (Herrera 1984, Snow et Snow 1988, Debussche et Isenmann 1989), sont présentes sur les sites d'étude (tableau 3.7). Cependant, même si la Pivoine officinale présente un syndrome d'ornithochorie, ses caractéristiques la classe comme marginale par rapport aux espèces à fruits charnus disséminés par les oiseaux en zone méditerranéenne et fructifiant sur la même période (Herrera 1982, 1984, 1987, Debussche et Isenmann 1989) (cf. encadré). Par ailleurs, aucune observation de prédation des graines par les oiseaux n'a été faite ni pour *P. officinalis* durant les 4 années d'étude, ni pour deux espèces proches ayant un syndrome d'ornithochorie bien plus marqué : *P. cambessedesii* (A. Traveset, com. pers.) et *P. broteroi* (P. Jordano, com. pers.). Le rôle des oiseaux dans la dissémination semble donc être assez marginal. Celui des sangliers, qui n'avaient pas été pris en compte initialement dans l'expérimentation, semble bien plus probable et il est confirmé par de nombreuses marques sur les dispositifs expérimentaux. Les sangliers ne recherchent probablement pas les graines de Pivoines puisqu'ils laissent intactes les infrutescences, mais en fourrageant au sol pour trouver leur nourriture ils pourraient les enfouir, les déplacer, voire les ingérer accidentellement (Gérard *et al.* 1991).

A partir de la liste des disséminateurs potentiels, le schéma de dissémination des graines peut être en partie inféré. Tout d'abord, le nombre de graines produites en milieu fermé, et donc disponibles pour la dissémination, est plus faible qu'en milieu ouvert. Par ailleurs, en milieu ouvert, la barochorie est le mode de dissémination principal alors qu'en milieu fermé, une partie des graines est collectée, principalement par des rongeurs. Or, *A. sylvaticus*, comme de nombreux rongeurs, est principalement prédateur des graines : seule une faible partie des graines qu'il collecte échappe à la prédation et est capable de germer (Jensen 1985, Hollander et Vander Wall 2004, Hulme et Kollmann 2005). Ces graines sont stockées et éventuellement disséminées à proximité de leur source, en majorité dans un rayon de 10 m (Jensen 1985, Hulme et Kollmann 2005). Les oiseaux frugivores disséminent la plupart des graines dans un rayon de 200 m dans un habitat hétérogène (Debussche et Isenmann 1994), et à quelques dizaines de mètres en milieu ouvert (Debussche *et al.* 1985). Les sangliers pourraient déplacer les graines à courte distance en recherchant leur nourriture et, comme une grande quantité des graines qu'ils ingèrent est retrouvée intacte dans leurs fèces (Génard et Lescourret 1985), les graines de Pivoines ingérées accidentellement pourraient être ainsi exceptionellement disséminées à longue distance. Enfin, le comportement des disséminateurs

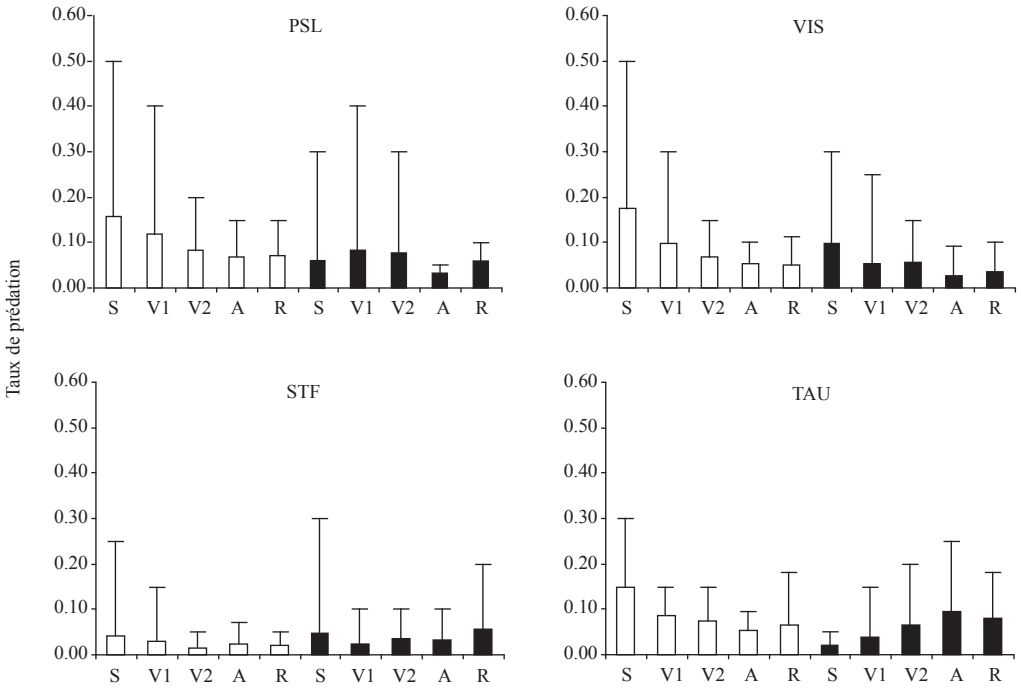


Figure 3.11. Taux de prédation moyens (et centile 95%) par site, par milieu (milieu ouvert en blanc, milieu fermé en noir) et par stade morphologique (P = plantules, V1 = végétatif 1, V2 = végétatif 2, A = avorté et R = reproducteur, cf chapitre dynamique des populations).

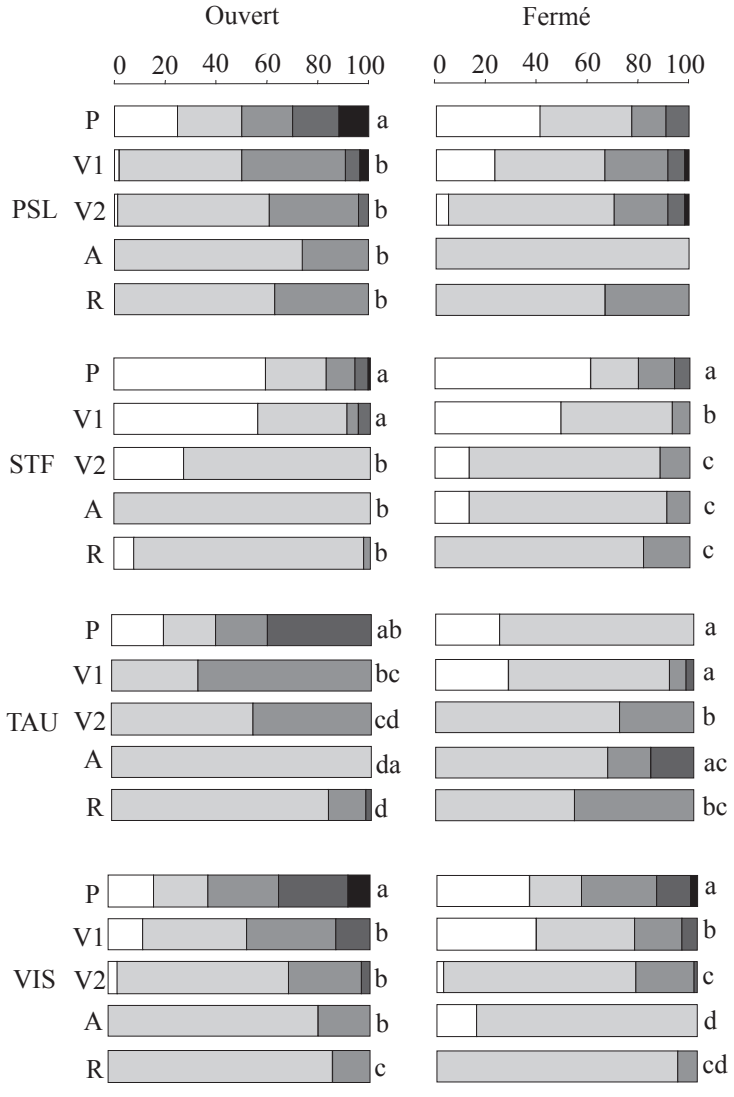


Figure 3.12. Pourcentages d'individus des différents stades dans chaque classe de prédation pour chaque site et chaque milieu : 0% = blanc ; 1-10% = gris clair ; 11-25% = gris moyen ; 26-50% = gris foncé ; 50% et plus = noir. La proportion d'individus dans chaque classe de prédation diffère entre stades Au sein de chaque milieu dans chaque site (tests $\chi^2 16$, $p < 0.05$) sauf dans le milieu fermé au PSL ($p > 0.05$). Les stades ont ensuite été comparés deux à deux avec des tests de χ^2, les stades différant significativement entre eux étant indiqués par des lettres différentes.

potentiels permet de faire des hypothèses sur le lieu de dépôt des graines : il correspond au milieu fermé en ce qui concerne les rongeurs, et au milieu fermé et aux arbres isolés en ce qui concerne les oiseaux (Debussche et Isenmann 1994).

La situation est donc paradoxale : le milieu où les graines sont produites en plus grand nombre et le milieu où les disséminateurs potentiels sont présents en plus grand nombre ne coïncident pas. On peut donc faire l'hypothèse que dans un tel système, les lisières jouent un rôle important puisqu'elles rapprochent les disséminateurs du milieu de production des graines. Par ailleurs, dans un contexte de fermeture forestière et d'homogénéisation du paysage, ce patron spatial de dissémination pourrait avoir comme conséquences de réduire les flux de gènes entre populations et la probabilité de coloniser de nouveaux sites favorables, et d'agir négativement sur un éventuel fonctionnement en métapopulation (Willson et Traveset 2000, Johst *et al.* 2002, Levin *et al.* 2003). L'analyse de la structuration génétique intra- et inter-populations permettrait de préciser l'importance des flux de graines dans la dynamique de cette espèce.

3.2.4 Herbivorie

Méthodologie et résultats

Les objectifs de ce chapitre sont de déterminer si les taux d'herbivorie (1) diffèrent selon les stades morphologiques, (2) présentent une variabilité spatiale et / ou temporelle entre sites, milieux ou individus, et (3) de déduire des résultats les impacts potentiels sur la dynamique des populations.

Le taux d'herbivorie des individus présents dans les quadrats de démographie correspond au rapport entre la surface foliaire consommée et la surface foliaire totale de chaque individu. Le pourcentage de surface foliaire consommée est estimé visuellement pour chaque tige, puis multiplié par la surface foliaire de chaque tige afin de calculer le taux d'herbivorie au niveau de l'individu (surface consommée totale/surface foliaire totale).

Les variances des pourcentages de surface foliaire consommée varient énormément entre stades, mais diminuent lorsque le stade augmente. Ainsi, dans tous les sites et milieux (à l'exception de TAU en milieu fermé à cause d'un faible effectif), le stade Plantule est le seul stade qui montre toujours plusieurs individus consommés à plus de 25 % (figure 3.11). Les taux d'herbivorie ont donc été comparés entre les stades grâce à des tests χ^2, en dénombrant les individus dans 5 classes de pourcentage d'herbivorie (0%, 1-10%, 11-25%, 26-50% et 51-100%). Les taux diffèrent significativement entre stades dans tous les sites et milieux (sauf en milieu fermé à PSL), les différences significatives concernant les comparaisons entre les stades les plus jeunes et les plus matures (figure 3.12). Les individus du stade Plantule se répartissent dans toutes les classes d'herbivorie, d'individus indemnes à des individus dont le feuillage est consommé à plus de 50 %, alors que les individus matures sont systématiquement attaqués (sauf quelques individus de milieu ouvert à SFT qui n'ont aucune trace d'herbivorie) et de façon plus homogène (les individus se répartissent dans peu de classes de taux d'herbivorie, en général intermédiaires). Le passage entre le type d'impact caractéristique des Plantules et celui caractéristique des individus matures est

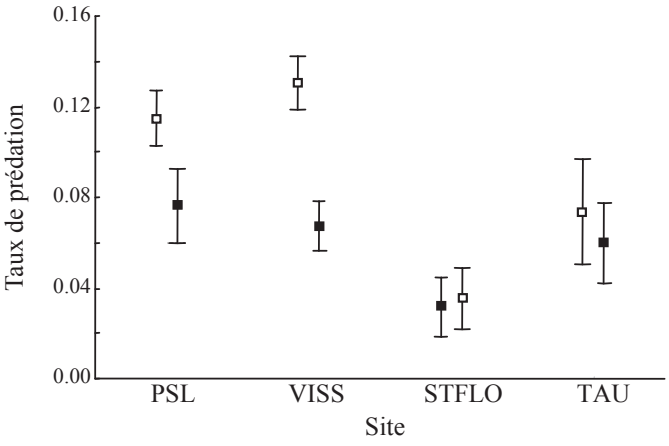


Figure 3.13. Taux de prédation moyen du feuillage ± SE) en 2003 entre sites et entre milieux (milieu ouvert = carrés blancs, milieu fermé = carrés noirs).

(A)

Milieu	Année	*n*	*KW*	*p*	Comparaison
ouvert	2003	896	191.7	< 0.001	STF<(VIS, TAU, PSL)
	2004	768	193.5	< 0.001	STF<VIS<(TAU, PSL)
	2005	864	124.7	< 0.001	STF<VIS<(TAU, PSL)
fermé	2003	847	44.9	< 0.001	STF<(VIS, TAU, PSL)
	2004	797	132.6	< 0.001	(STF,VIS)<(TAU, PSL)
	2005	798	113.3	< 0.001	STF<VIS<(TAU, PSL)

(B)

Site	Stade	n	U	p	comparaison
PSL	P	126	775.5	0.016	O>F
	V1	115	1234.0	0.013	O>F
	V2	135	1799.5	0.041	O>F
	R	-	-	-	
VIS	P	273	6417.0	< 0.001	O>F
	V1	176	2488.5	< 0.001	O>F
	V2	113	916.5	0.045	O>F
	R	54	260.5	0.070	
TAU	P	-	-	-	
	V1	41	51.5	0.003	O>F
	V2	84	347.0	0.468	
	R	61	197.0	0.042	O<F
STF	P	147	2400.0	0.996	
	V1	137	2280.5	0.770	
	V2	101	718.5	0.003	O<F
	R	49	130.0	0.057	

Tableau 3.8. (A) Comparaison des taux de prédation entre sites pour les deux milieux et les trois années de suivis (tests de Kruskal Wallis). Les résultats sont cohérents entre milieux et entre années. (B) Comparaison du taux de prédation entre milieu ouvert et milieu fermé pour chaque stade morphologique (sauf A , R du PSL et P de TAU à cause d'effectifs trop faibles) au sein de chaque site (tests U de Mann Whitney). Les sites différant significativement ($p < 0,05$) sont identifiés avec des < ou > selon le sens de la variation.

progressif (figure 3.12).

Les taux d'herbivorie présentent une variabilité interannuelle significative (ANOVA à données répétées de Friedman, $p < 0.05$ dans chaque milieu pour chaque site), et les valeurs faibles des coefficients de concordance de Kendall (< 0.1) indiquent que les individus ne présentent pas des variations similaires entre eux, et donc que ce ne sont pas les mêmes individus qui sont systématiquement consommés chaque année. Les taux d'herbivorie présentent aussi une variabilité spatiale (figure 3.13). Ils diffèrent entre sites en milieu ouvert ($KW = 191.7$, $p < 0.001$) et en milieu fermé ($KW = 44.9$, $p < 0.001$), les individus du site STF étant significativement moins attaqués que ceux des autres sites (Test de Dunn, $p < 0.05$, tableau 3.8 A). Les comparaisons entre les deux types de milieu sur chaque site (en 2003) indiquent une tendance à la prédation plus forte en milieu ouvert (figure 3.13) : le taux d'herbivorie est significativement plus élevé en milieu ouvert qu'en milieu fermé à VIS ($U = 34348$, $p < 0.001$), PSL ($U = 16296$, $p < 0.001$) et TAU ($U = 4071$, $p = 0.016$), mais est plus élevé en milieu fermé à STF ($U = 23870.5$, $p = 0.022$) qui correspond à la population où les taux d'herbivorie sont les plus faibles. Si on compare les taux entre milieux par stade morphologique, cette différence persiste à VIS et PSL pour les stades Plantule, Végétatif 1 et Végétatif 2 mais il n'y a pas de différence significative pour les individus Reproducteurs. A TAU, le sens de variation dépend du stade considéré, et à STF seuls les individus du stade Végétatif 2 présentent une prédation plus élevée en milieu fermé (tableau 3.8 B). Tous stades et sites confondus, le taux de prédation est corrélé négativement à la fermeture du milieu par les ligneux hauts (corrélation significative avec le premier axe de l'ACP, $r_{sp} = 0.23$, $p = 0.024$) et négativement à la fermeture par les ligneux bas (corrélation significative avec le deuxième axe de l'ACP $r_{sp} = 0.39$, $p < 0.001$) (Figure 3.14).

Un faible taux d'herbivorie

La Pivoine officinale ne présente aucune défense physique mais elle possède des composés secondaires connus pour leurs propriétés anti-herbivores comme des tanins, des mono- et des di-terpènes (Fournier 1948, Bézanger-Beauquesne *et al.* 1980, Leung et Foster 1996, Bruneton 1999), ce qui pourrait expliquer les faibles taux de prédation chez cette espèce. La forme des attaques sur les feuilles et l'observation directe suggèrent que les prédateurs sont principalement des invertébrés, parmi ceux-ci des charançons (Coléoptères, Curculionidés), des sauterelles juvéniles (Orthoptères, Tettigoniidés, qui consomment aussi les follicules) et des larves d'Hyménoptères (Symphyte). Les sangliers, nombreux dans les sites d'études, ne consomment pas leurs racines mais les extraient parfois du sol en cherchant leur nourriture. Les Cervidés ne consomment pas le feuillage de cette espèce sur les sites d'étude et semblent même l'éviter (dans un site non étudié, toutes les espèces herbacées du sous-bois étaient sévèrement broutées, en particulier *Cardamine pentaphyllos* L., seules les Pivoines étaient indemnes), alors qu'ils consomment les boutons floraux et/ou follicules. Chez *P. broteroi*, une prédation par les Cervidés ou le bétail a été mise en évidence au moment de l'emergence des individus (Sanchez-Lafuente *et al.* 1999, Sanchez-Lafuente 2002) ; ceci est évidemment à prendre en compte si une gestion des habitats de Pivoine par le pastoralisme

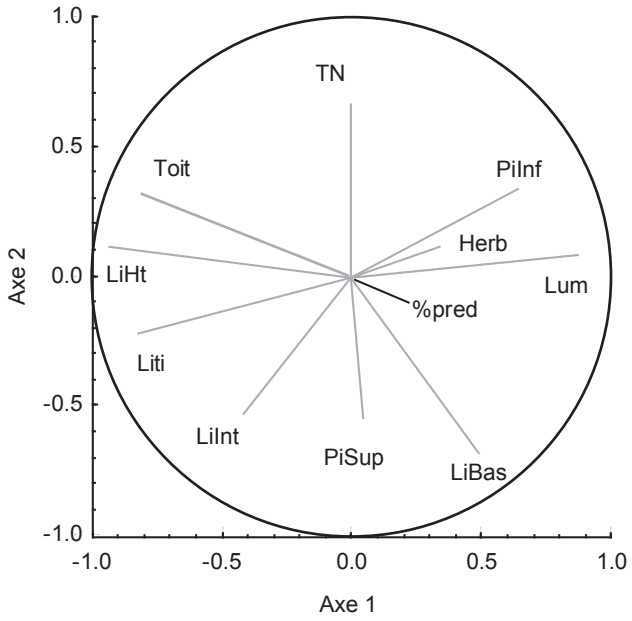


Figure 3.4. Cercle des corrélations de l'ACP sur les variables écologiques des quadrats de démographie en 2003 (en gris), avec en variable supplémentaire le taux de prédation moyen par quadrat (en noir). Le premier axe est un axe de fermeture du milieu par les ligneux hauts expliquant 39.29% de la variance, le deuxième axe est un axe de fermeture par les ligneux bas et de taille intermédiaire, expliquant 17.76% de la variance.

est envisagée.

La prédation est plus sévère pour les stades juvéniles (les taux de prédation pouvant dépasser les 50 %) que pour les stades adultes, ce qui est vraisemblablement dû aux différences de surface foliaire des individus des différents stades. L'impact de la prédation est potentiellement plus grave pour les plantules qui possèdent peu de réserves. Pourtant, leur taux de mortalité ne dépend pas du taux de prédation (cf chapitre 3.3). Les évènements de prédation au stade juvénile pourraient se répercuter plus tard dans le cycle de vie, par exemple sur la croissance et la reproduction future (Hanley et May 2006). Par ailleurs, le fait que ce ne sont pas les mêmes individus qui sont systématiquement attaqués chaque année suggère qu'il n'y a pas d'individus possédant de meilleures défenses que d'autres.

Les taux de prédation diffèrent entre les sites d'étude. Les mêmes différences se retrouvant dans les deux types de milieu et chaque année, ceci suggère des différences d'abondance ou de composition du cortège d'espèces prédatrices entre sites. Les taux de prédation présentent aussi une variabilité inter-annuelle au sein de chaque site et chaque milieu, suggérant des variations temporelles locales d'abondance des prédateurs. Enfin, il y a une tendance à une plus forte prédation en milieu ouvert. Il parait peu probable que ces différences soient induites par les prédations différentielles entre stades car les structures démographiques sont relativement similaires entre sites pour chaque type de milieu. La plus forte prédation en milieu ouvert pourrait être due au cortège des espèces prédatrices, qui semblent être des espèces surtout inféodées aux milieux ouverts (au moins pour les espèces d'invertébrés observées).

Les taux de prédation faibles, variables à la fois dans le temps et dans l'espace mais aussi entre individus et entre stades rendent complexe une analyse des impacts de l'herbivorie sur la dynamique des populations de Pivoines. Les analyses d'élasticités peuvent permettre d'estimer l'impact potentiel sur la dynamique. Dans les parties des populations en décroissance ou stables, le taux d'accroissement asymptotique est particulièrement sensible à la survie des individus végétatifs, et non à leur croissance. On peut donc supposer que l'impact de la prédation sera important uniquement si il diminue la survie des individus mais sera faible si il diminue leur croissance. Les individus végétatifs adultes présentant des taux de prédation faibles, le risque de mortalité semble minime. Dans les populations présentant une croissance importante, le taux d'accroissement asymptotique est principalement sensible à la survie des individus végétatifs reproducteurs, et à moindre mesure à la progression des individus d'un stade à l'autre. Les taux de prédation ne semblent pas avoir d'impact sur la survie des individus. Cependant, si les taux de prédation étaient suffisants pour réduire la croissance des individus, une répercussion sur le taux d'accroissement des populations est probable. Ceci est valable aussi bien pour une prédation par les invertébrés et par les ongulés sauvages, mais aussi pour les ongulés domestiques, ce qui devra être pris en compte si une gestion du milieu par le pâturage doit être envisagée.

3.3 RECRUTEMENT DES PLANTULES

3.3.1 Contexte

Les évènements se produisant dans les phases précoces du cycle de vie, comme par exemple la prédation, peuvent jouer un rôle déterminant non seulement pour la survie mais aussi pour les performances futures des individus (Fowler et Antonovics 1981, Hanley et May 2006). Ceci peut être constaté lors de réintroductions : les individus réintroduits au stade juvénile peuvent présenter une meilleure survie, croissance et floraison que les individus réintroduits à l'état de graines (Jusaitis *et al.* 2004). Le recrutement des plantules, c'est-à-dire leur succès d'installation, est donc considéré comme la phase critique du cycle de vie (Harper 1977). Ses composantes, c'est-à-dire la persistance de la banque de graines, la germination et l'établissement des plantules, doivent être distinguées car les conditions favorables à l'une ne sont pas forcément favorables à l'autre (Isselstein *et al.* 2002).

Des travaux théoriques et empiriques montrent que le rôle de la banque de graines est primordial pour la viabilité des populations dans des environnements à forte stochasticité (Cohen 1966, Clauss et Venable 2000, Riba *et al.* 2002, Adams *et al.* 2005). Ainsi, si peu de graines germent chaque année, on peut s'attendre à une faible croissance de la population mais à une viabilité forte puisque la germination s'étale sur une succession de bonnes et mauvaises années. En revanche, si toutes les graines germent la même année, on peut s'attendre à une forte croissance de la population si l'année est favorable à la germination mais, si l'année est défavorable, à un déficit de recrutement pouvant augmenter le risque d'extinction de la population (Crawley 1983, Baskin et Baskin 1998). Cette relation entre viabilité des populations et durée de la banque de graines est en fait plus complexe, en particulier à cause de trade-off adaptatifs entre cette durée, la taille des graines et les modalités de dissémination (Venable et Brown 1988). Les données sur les banques de graines sont difficiles à obtenir et malgré son importance, ce stade démographique a longtemps été ignoré dans les modèles de dynamique des populations. La durée de persistance des graines dans le sol peut être déterminée en partie par le type de dormance des graines. Celle-ci caractérise l'état d'une graine intacte et viable qui ne germe pas alors que les conditions de germination sont favorables, c'est-à-dire dans des conditions telles que les taux d'humidité et d'oxygène sont adéquats et que les températures sont dans la gamme permettant la croissance d'une plante (Baskin et Baskin 1998).

Le taux de germination (e.g. Harper 1977, Kery *et al.* 2000, Navarro et Guitian 2003) puis le succès d'établissement des plantules (e.g. Fowler et Antonovics 1981, Krenova et Leps 1996, Riba *et al.* 2002, Navarro et Guitian 2003, Jusaitis 2005) présentent souvent une grande variabilité spatio-temporelle dépendant des caractéristiques locales du milieu, qu'elles soient biotiques (compétition, facilitation et prédation) ou abiotiques (conditions physico-chimiques locales) (Fenner 1985). Le site de dépôt des graines va donc jouer un rôle majeur dans le succès de germination et le recrutement (Hollander et Vander Wall 2004). Ainsi, la survie des plantules dépend principalement de la disponibilité en eau et en nutriments dans certains habitats contraignants (Dejong et Klinkhamer 1988, Isselstein *et al.* 2002), alors que leur survie est plus souvent limitée par la compétition et donc les perturbations locales dans des habitats plus riches (Bullock *et al.* 1995). Par ailleurs, le site de dépôt le plus fréquent peut ne pas être le site le plus favorable pour la germination des graines

Type de dormance	Mécanismes bloquant la germination
physique	imperméabilité à l'eau
chimique	production d'inhibiteurs par les structures entourant l'embryon
mécanique	présence d'une envelope rigide
physiologique	physiologie de l'embryon empêchant l'émergence de la radicule
morphologique	embryon indifférencié ou peu développé

Tableau 3.9. Les cinq principaux types de dormance. Les trois premiers types constituent la dormance exogène, car celle-ci est induite par des caractéristiques des structures entourant l'embryon (endosperme, manteau de la graine,...). Les deux derniers types constituent la dormance endogène car se sont les caractéristiques de l'embryon lui-même qui provoquent la dormance. Des combinaisons de ces cinq types sont possibles, comme on le voit chez la Pivoine officinale.

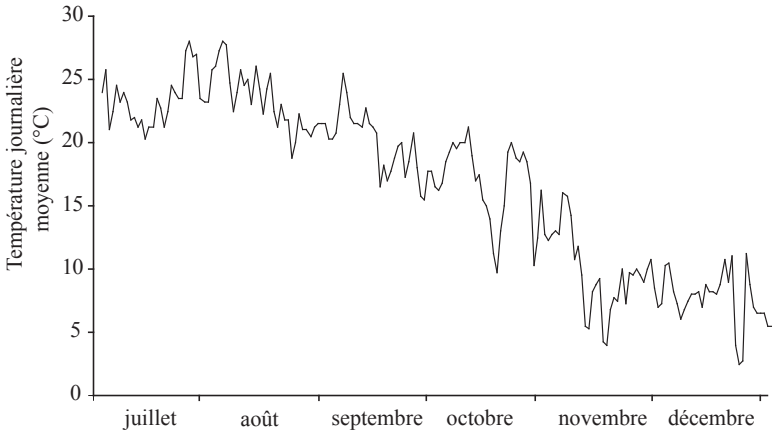


Figure 3.15. Variation des températures moyennes journémières mesurées sur le terrain d'expérimentation du CEFE entre juillet et décembre 2004.

(Bustamante *et al.* 1992). Un micro-habitat favorable pour la germination n'étant pas forcément favorable à l'établissement des plantules (Isselstein *et al.* 2002), il est donc important de relier le patron de dissémination des graines avec la favorabilité du site de dépôt pour chacun d'entre eux.

Les informations sur le recrutement sont essentielles pour déterminer les modalités de réintroductions ou de renforcements des populations et pour améliorer leur efficacité. Elles permettent d'identifier les micro-habitats ou les modes de gestion les plus favorables à la régénération (Krenova et Leps 1996, Hampe et Arroyo 2002, Jusaitis 2005), de choisir entre réintroduire des graines ou des plantules (Budelsky et Galatowitsch 1999, El-Kassaby et Edwards 2001, Isselstein *et al.* 2002, Jusaitis 2005), et d'estimer le nombre de graines ou d'individus devant être réintroduits.

Les objectifs de ce chapitre sont donc de déterminer les modalités du recrutement des plantules et plus précisément de répondre qux questions suivantes : (1) quel est le type de dormance des graines de la pivoine officinale ? (2) Quelle est la variabilité spatiale de la germination (à l'échelle des sites, des milieux et des micro-habitas) ? Enfin (3) quelles sont les sources de variabilité de la survie des plantules ?

3.3.1. Type de dormance et conséquences démographiques

Méthodologie et résultats

Cinq types principaux de dormance ont été décrits (Baskin et Baskin 1998) et nommés en fonction de l'origine de cette dormance : physique, chimique, mécanique, physiologique et morphologique (tableau 3.9). Une dormance d'origine à la fois morphologique et physiologique (dite dormance morpho-physiologique -DMP-) a été détectée pour toutes les espèces de pivoines étudiées jusqu'a présent, qu'elles soient ligneuses (*P. ostii* (Wang et van Staden 2002), *P suffruticosa* (Barton 1933) ou herbacées (*P. californica* (Schlising 1976), *P. lactiflora* (Buchheim *et al.* 1994)). Une fois dans des conditions favorables, c'est-à-dire en terre et avec des conditions d'hygrométrie permettant son hydratation, deux étapes sont nécessaires à la germination d'une graine à DMP. D'abord, la dormance morphologique doit être levée afin de déclencher la différentiation et/ou la croissance de l'embryon, car l'embryon est initialement indifférencié ou peu développé. Ensuite, la dormance physiologique doit être levée à son tour pour provoquer la germination. Le facteur impliqué dans la levée de ces deux dormances est la température, et plus précisément les hautes ($\geq$ 15 °C) ou les basses (0-10°C) températures. Il existe donc quatre types de combinaisons thermiques permettant la germination des graines à DMP: uniquement des hautes ou uniquement des basses températures, la succession de hautes puis de basses températures ou l'inverse (Baskin et Baskin 1998).

Les objectifs de cette partie sont de déterminer si *P. officinalis* présente le même type de dormance que les autres espèces de Pivoines et d'en déduire les conséquences démographiques potentielles. Des observations préliminaires ont indiqué que la germination de *P.officinalis* se produisait le premier ou le second printemps après la plantation des graines : une expérimentation en conditions contrôlées a donc été réalisée afin de déterminer si la date de plantation des graines influençait l'année de germination. Des graines ont été prélevées à Vissec le 19/07/2004 au moment

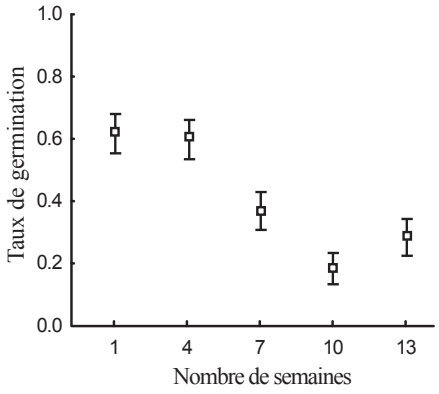


Figure 3.16. Variation du taux de germination (moyenne ± SE) en fonction du nombre de semaines écoulées entre la date de déhiscence du follicule et la date de plantation des graines.

Traitement	Nb semaines entre récolte et plantation	Paramètre de régression β ± se	Wald χ^2	*p*	Hazard ratio (IC 95%)	Tests
T1	1	1.11 ± 0.27	16.4	< 0.001	3.04 (1.77 - 5.19)	ab
T2	4	1.39 ± 0.27	26. 5	< 0.001	4.04 (2.37 - 6.87)	a
T3	7	0.73 ± 0.28	7.0	0.008	2.08 (1.21 - 3.58)	b
T4	10	0				
T5	13	0.01 ± 0.30	< 0.1	0.989	1.00 (0.55 - 1.82)	c

Tableau 3.10. Analyses de survie portant sur la germination des graines l'année suivant leur plantation. Des modèles de Cox (Cox Proportional Hazard Model, cf article annexe 2.4 pour les détails de ce type d'analyse) ont été utilisés, avec la semaine d'émergence de chaque plantule comme variable dépendante et chaque traitement comme variable explicative, le traitement T4 (plantation après 10 semaines) étant le traitement de référence (son paramètre de régression β est donc fixé à 0). Les traitements T5 et T4 ne sont pas significativements différents, les traitements T1, T2 et T3 sont significativement différents de 0 et les traitements T2 et T3 sont significativement différents l'un de l'autre.

Expérimentation	Nb semaines entre récolte et plantation	Nb jours ≥ 15°C	% de germination la 1ère et la 2e année	Groupe	Nb graines plantées	Date de récolte	Date de plantation
dormance	1	75	71.7 - nc	maximum	60	19/07/04	28/07/04
dormance	4	57	83.3 - nc	«	60	19/07/04	16/08/04
in natura 04	6	75	82.8 - nc	«	1218	13/07/04	28/07/04
dépression	6.5	49	81.0-05.9	«	290	12/07/03	28/08/03
dormance	7	47	61.7 - nc	«	60	19/07/04	06/09/04
dormance	10	26	40.0 - nc	intermédiaire	60	19/07/04	28/09/04
dormance	13	10	38.3 - nc	«	60	19/07/04	18/10/04
in natura 03	15.5	0	04.1 - 78.0	minimum	1521	12/07/03	28/10/03

Tableau 3.11. Pourcentages de germination des graines de Pivoine officinale et caractéristiques des expérimentations. Avec : dormance = expérimentation sur la dormance, dépression = individus issus d'allofécondations dans l'expérimentation de dépression de consanguinité, in natura 03 et 04 = graines semées en 2003 et en 2004 en prévision d'une réintroduction in natura, nc = % de germination la deuxième année après la plantation non encore connu.

de la déhiscence des follicules. Elles ont été réparties en 5 groupes (n = 60 graines par groupe) puis stockées 1, 4, 7, 10 et 13 semaines dans des sachets en papier au laboratoire, au sec et à température ambiante (25-30 °C), avant d'être semées. Les plantations ont été faites sur le terrain d'expérience du laboratoire, dans des pots en plastique d'une contenance de 5 L (n = 12 graines par pot) qui ont été arrosés juste après la plantation. La qualité et la quantité de substrat devant être identiques pour chaque pot, tous ont été remplis en même temps d'un mélange constitué de 1/3 de terre franche, 1/3 de terreau et 1/3 de sable, et pesés. Ainsi, une fois plantées et hydratées, les graines ont subit des nombres différents de jours avec des températures moyennes ≥ 15°C ((température journalière minimum+ température journalière max)/2), mesurées sur le terrain d'expérience). Ce nombre de jours est d'autant plus faible qu'elles ont été plantées tard. Commes elles ont toutes été plantées avant que la température moyenne journalière ne descende en dessous de 10°C (qui correspond à la date du 17 octobre), elles ont donc subit le même nombre de jours avec des températures moyennes ≤ 10°C (figure 3.15). Le nombre de germinations a été noté chaque semaine en 2005. Cette expérience demande deux années de suivi pour être menée à bien, mais seuls les résultats de la première année de suivi (2005) sont disponibles. Cependant, deux autres expérimentations impliquant des germinations en conditions contrôlées ont montré que le taux de germination au bout de deux ans est élevé (86,9 % et 82,2 %). Il sera donc fait l'hypothèse que le taux de viabilité des graines est identique entre la première et la seconde année et que, parmi les graines viables, la proportion de graines germant la seconde année est égale à 1 moins la proportion de graines germant la première année.

Le taux de germination le printemps suivant la production des graines dépend de la date de plantation : plus les graines ont été plantées tardivement, plus le taux de germination le printemps suivant est faible (figure 3.16) et donc, d'après notre hypothèse, plus le taux de germination le second printemps sera élevé. Des analyses de survie mettent en évidence deux groupes ayant des taux de germination significativement différents : les graines ayant été plantées ≤ 7 semaines et > 7 semaines après leur récolte (tableau 3.10). Afin d'augmenter le jeu de données, trois autres expérimentations ont été considérées et, là encore, les taux de germination le printemps suivant la plantation ont été d'autant plus faibles que la plantation a été tardive (tableau 3.11) : ainsi, la corrélation entre le taux de germination la première année et le nombre de jours où la température était ≥ 15° C une fois les graines plantées est forte et positive (r_{sp} = 0.862, p = 0.005).

Connaissant (1) le taux de chute des graines des follicules au cours du temps en conditions naturelles, en milieu ouvert et en milieu fermé (cf. chapitre 3.2.3) et (2) la proportion des graines germant la première année en conditions contrôlées, en fonction du nombre de semaines écoulées entre la date de déhiscence des follicules et la date de plantation des graines, il est possible d'estimer la proportion de graines viables d'une population pouvant germer la première année après dissémination. Cette proportion ne prend donc pas en compte la mortalité des graines par prédation et la qualité du site de dépôt des graines. A partir du tableau 3.11 , trois groupes ont été déterminés de façon subjective, correspondant à un taux de germination maximum (0.7609 ± 0.0418, n = 5 expérimentations , < 7 semaines entre la récolte et la plantation des graines), intermédiaire (0.3917 ± 0.0083, n = 2 , de 7 à 13 semaines incluses) et bas (0.0414 , n = 1 , > 13 semaines), les groupes

maximum et intermédiaires étant significativement différents ($U < 0.01$, $p = 0.034$) (tableau 3.11). Il semble donc qu'en conditions de germination optimales et sans prédation, une petite majorité des graines germe la première année, soit 50,4 % en milieu ouvert et 53,9 % en milieu fermé, le pourcentage restant correspondant aux graines non viables (< 20 % d'après les expérimentations en conditions contrôlées) et aux graines germant la seconde année (soit environ 30 %).

Une germination des graines en deux ans

Les faits que (1) la germination ait lieu le premier ou second printemps après la plantation, (2) deux levées de dormance impliquant d'abord des hautes puis des basses températures soient nécessaires et que (3) la période d'émergence des plantules (fin mars) soit la même quelque soit la date de plantation des graines sont caractéristiques d'une espèce dont les graines présentent une DMP (Baskin et Baskin 1984, Baskin et Baskin 1998). L'année de germination va donc dépendre de la date d'enfouissement de la graine qui, d'après les observations de terrain (cf. chapitre 3.2.3), peut être très variable, depuis la déhiscence des follicules en juillet jusqu'en janvier, voire un peu au-delà pour une très faible fraction des graines. Les graines disséminées avant l'automne auront une forte probabilité de germer le printemps suivant : elles subiront une stratification chaude en été puis une stratification froide durant l'hiver et germeront ensuite au printemps. En revanche, celles disséminées en automne ou en hiver ne germeront que le second printemps suivant leur dissémination : la durée de la stratification chaude n'étant pas suffisamment longue, la croissance de l'embryon ne débutera pas avant le printemps et l'été de l'année suivante, et la germination ne pourra débuter qu'après la levée de la seconde dormance grâce à la stratification froide pendant le second hiver (Baskin et Baskin 1991). Baskin et Baskin (1998) ont avancé l'hypothèse que, chez les espèces ayant un embryon indifférencié ou peu développé et donc une dormance morphologique, la dormance physiologique est un moyen d'empêcher la germination pendant ou juste avant des périodes défavorables ; ce double mécanisme pourrait avoir évolué chez des espèces soumises à des climats où certaines saisons sont particulièrement sechess ou froides. Par ailleurs, les expérimentations montrent que même si la première levée de dormance (par températures élevées) ne s'est pas produite, il y a toujours chez la Pivoine officinale une proportion de graines germant la première année. L'expérimentation sur la dépression de consanguinité, où l'origine maternelle est connue pour chaque graine, montre que cette absence de première dormance ne concerne qu'un nombre limité de plantes mères (9 sur 46), et un nombre limité de leurs graines (21 ± 5 %).

Les dates de dissémination des graines différant entre milieux ouvert et fermé, la proportion de graines pouvant germer la première année après la dissémination diffère, mais faiblement, entre les deux milieux (50,4 % en milieu ouvert et 53,9 % en milieu fermé). Cependant, les taux de prédation des graines et les conditions optimales de germination n'étant actuellement pas quantifiés avec précision, il semble plus judicieux de considérer pour la dynamique des populations une probabilité de germination globale résultant des observations des placettes de semis. A ce stade de l'étude, on ne sait pas si la durée de la banque de graines dans le sol excède 2 ans, mais elle est probablement courte. En effet, les graines de la Pivoine officinale sont de grande taille, et la taille des graines est

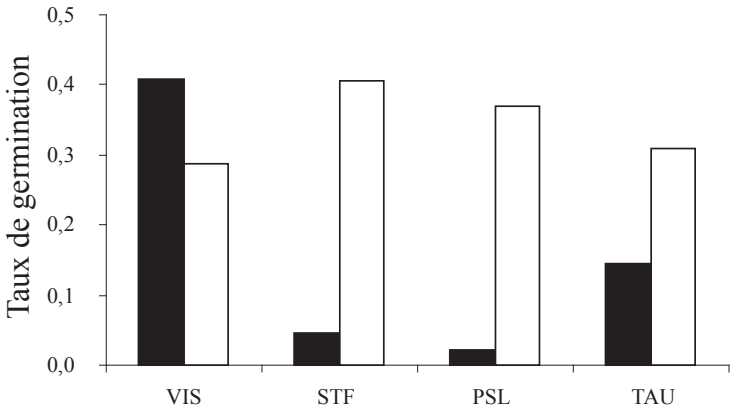


Figure 3.17. Taux de germination cumulés après deux ans de suivi dans chaque site et et dans chaque milieu (milieu ouvert : en blanc, milieu fermé : en noir).

(A)

	χ^2	p
PSL ouvert	1.3	0.515
STF ouvert	28.4	< 0.001
TAU ouvert	18.7	0.002
VIS fermé	16.7	0.005
VIS ouvert	25.5	< 0.001

(B)

Comparaison	χ^2	p	Odds ratio (IC)
tous sites milieu ouvert	6.6	0.085	
tous sites milieu fermé	74.6	< 0.001	
PSL / VIS	21.2	< 0.001	29.1 (6.9-122.0)
PSL / STF	0.7	0.387	
PSL / TAU	7.1	0.008	7.3 (1.7-31.4)
STF / VIS	46.4	< 0.001	14.5 (6.7-31.4)
STF / TAU	9.5	0.002	3.6 (1.6-8.3)
TAU / VIS	27.9	< 0.001	4.0 (2.4-6.7)

(C)

	χ^2	p	Odds ratio (IC) O/F
VIS	6.0	0.014	0.6 (0.4-0.9)
STF	44.8	< 0.001	14.4 (6.6-31.4)
PSL	18.4	< 0.001	24.9 (5.7-108.1)
TAU	12;2	< 0.001	2.5 (1.5-4.3)

Tableau 3.12. Régressions logistiques testant l'effet du site, du milieu et de la placette de semis sur le taux de germination. Certaines placettes n'ayant eu aucune germination, le modèle complet comprenant tous les facteurs n'est pas testable, deux tests différents ont donc été faits. Tout d'abord, l'effet placette dans chaque milieu au sein de chaque site a été testé lorsque le taux de germination était non nul dans au moins deux placettes (A). Puis les effets site, milieu et leur interaction ont été testés : les trois étant significatifs (site : $\chi^2 3=37.3$, $p < 0.001$, milieu $\chi^2 1 = 44.3$, $p < 0.001$, interaction $\chi^2 3 = 64.0$, $p < 0.001$), des comparaisons des taux de germinations ont été effectuées entre sites pour chaque type de milieu suivis de comparaisons des sites deux à deux (B) (les comparaisons significativements différentes restent significatives après correction de Bonferroni). Enfin, les milieux ouverts et fermé ont été comparés dans chaque site (C).

corrélée négativement avec la durée de vie dans la banque de graines (Kiviniemi 2001), les graines de grande taille étant plus fréquemment consommées par les prédateurs ou détruites par les micro-organismes que celles de petite taille. De plus, les pourcentages de germination en conditions contrôlées au bout de deux ans étant élevés, la proportion de graines viables pouvant survivre plus de 2 ans dans le sol doit être faible. Seuls le suivi des placettes de semis et des expérimentations en conditions contrôlées permettront de le confirmer. Enfin, l'élasticité du taux d'accroissement aux transitions liées à la banque de graines est faible (annexe 1), ce qui suggère un rôle mineur de la banque de graines dans la dynamique des populations de Pivoine officinale.

3.3.2 Germination et établissement des plantules

Méthodologie et résultats

Germination – Les taux de germination au bout de deux ans (appelés taux de germination par la suite pour faciliter la lecture) ont été mesurés en milieux ouvert et fermé dans chaque station dans les placettes de semis situées à proximité des quadrats de démographie (cf. chapitre 2). Des régressions logistiques ont été utilisées pour tester l'effet du site, du milieu et de la placette sur le taux de germination. Une ACP a été réalisée sur les variables écologiques mesurées sur chaque quadrat de démographie le plus proche de chaque placette, en utilisant le taux de germination comme variable supplémentaire, puis la corrélation entre le taux de germination et les trois premiers axes de l'ACP a été testée par corrélation de Spearman.

La variabilité du taux de germination peut s'analyser à quatre niveaux différents. Premièrement, le taux de germination maximum observé dans les populations étudiées est de 41,8 % (figure 3.17), ce qui correspond à la moitié du taux de germination observé en conditions contrôlées. Deuxièmement, il n'y a pas de différence entre sites des taux de germination en milieu ouvert, mais on observe des disparités entre sites pour les taux de germination en milieu fermé : le taux de germination à VIS (fermeture par des essences caducifoliées) est significativement supérieur à celui de TAU (fermeture par des essences sempervirentes mais avec une forte proportion de caducifoliés), lui même significativement supérieur à ceux de STF et du PSL (fermeture par des essences sempervirentes avec une faible proportion de caducifoliés) (tableau 3.11, figure 3.17). Troisièmement, les taux de germination sont significativement différents entre milieu ouvert et milieu fermé au sein de chaque site. Mais, alors que sous couvert sempervirent dominant le taux de germination est nettement inférieur à celui en milieu ouvert (d'un facteur 2,5 à TAU, 24,9 au PSL et 14,4 à STF), le taux de germination sous couvert caducifolié est au contraire supérieur à celui en milieu ouvert (d'un facteur 1,7 à VIS) (tableau 3.12, figure 3.17). Quatrièmement, les taux de germination varient au niveau du micro-habitat, c'est-à-dire entre les placettes de semis au sein des milieux dans chaque site (tableau 3.12). Cependant, aucune corrélation significative entre le taux de germination et les trois premiers axes de l'ACP n'a été détectée (figure 3.18) : ceci pourrait indiquer que l'échelle pertinente du micro-habitat pour la germination est suffisamment petite pour que les conditions écologiques des quadrats ne renseignent pas sur celles des placettes d'habitat, soit du fait de leur trop grande surface (4 m^2), soit du fait de leur trop grand éloignement (2-5 m).

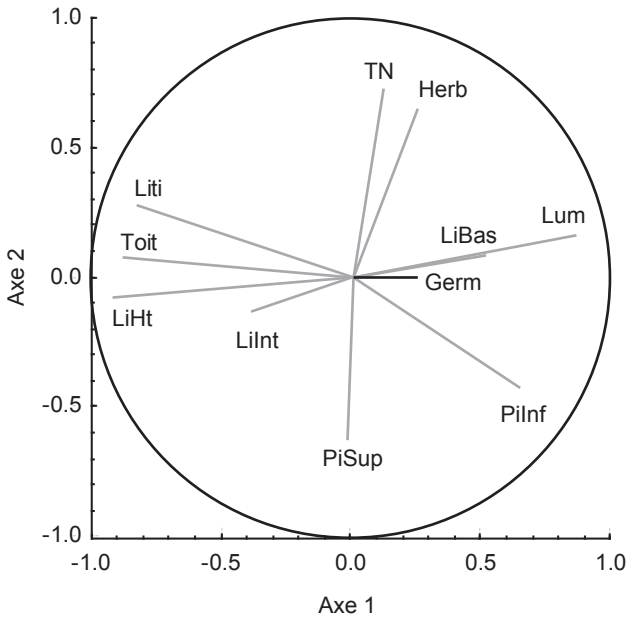


Figure 3.18. Cercle des corrélation de l'ACP avec les variables écologiques (2003) du quadrat de suivi de démographie le plus proche de chaque placette de semis en variables principales (gris) et le taux de germination (Germ) dans les placettes en variable supplémentaire (noir). Le premier axe explique 39.3 % de la variance et correspond à la fermeture du milieu par les ligneux hauts, le deuxième axe explique 16.7 % de la variance et correspond à la qualité du sol. Le taux de germination n'est pas corrélé avec les deux premiers axes de l'ACP ni en 2003 (axe 1 : rsp = -0.15, p = 0.351; axe 2 : rsp = 0.14, p = 0.391, n = 38), ni en 2005 (axe 1 : rsp = -0.17, p = 0.320; axe 2 : rsp = 0.28, p = 0.096, n = 37).

Tableau 3.13. Scores d'AIC de tous les modèles logistiques possibles comprenant les effets site (S), milieu (M), biomasse après transformation logarithmique (B) et pourcentage de prédation (P) sur la survie des plantules en 2004. Certaines combinaisons ne sont pas possibles car certains niveaux de facteurs présentent uniquement des taux de mortalité de 0 ou 1. Les sites utilisés sont ceux de VIS et STF, les seuls possédant des effectifs de plantules suffisants pour permettre les analyses. Tous les modèles expliquant une part significative de variance par rapport au modèle nul ont uniquement un effet biomasse significatif (résultats non montrés), les autres effets (prédation, milieu et site) et leurs intéractions n'étant pas significatifs.

Modèles	AIC
B	183.9
B+M+B*M	184.1
B+M	184.7
B+S	185.5
B+S+M+B*S+B*M+B*S*M	185.8
B+S+M	186.5
B+S+B*S	187.3
B+P	187.3
Modèle nul	*187.6*
B+M+P	188.0
B+S+P	188.7
M	189.3
B+S+M+P	189.6
B+P+B*P	189.8
P	191.2
S+M	191.2
M+P	192.8
S+P	193.1
S+M+S*M	193.2
S+P+S*P	194.6
M+P	194.8
M+P+M*P	196.1
B+M+P+B*M+B*P+M*P+B*M*P	197.0
B+S+P+B*S+B*P+B*S*P	198.4
S+M+P+S*M+S*P+M*P+S*M*P	200.9

Survie des plantules – Les plantules des placettes de semis et celles des quadrats de démographie ont été utilisées afin de déterminer les sources de variabilité du taux de mortalité. La taille des plantules est estimée par la surface foliaire (longueur*largeur de la feuille). Les taux de prédation des plantules (pourcentage de la surface de feuille consommée) dans les quadrats de démographie ont été relevés. Cette dernière variable ne permettant pas de satisfaire les conditions d'application des tests statistiques même après transformation, trois classes de pourcentage de prédation ont été construites a posteriori par une classification K-mean qui détermine des groupes en maximisant la variance inter-groupe tout en minimisant la variance intra-groupe (moyennes des taux de prédation ± SE :1er groupe : 0,002 ± 0,001, 2^{e} groupe : 0,095 ± 0,014, 3e groupe : 0,347 ± 0,019). Afin de déterminer quelles variables expliquaient une part de la variation du taux de mortalité des plantules en 2005, une sélection de modèles sur critère d'AIC a été réalisée sur tous les modèles logistiques possibles comprenant les facteurs site, milieu, taille de la plantule en 2004 (après transformation logarithmique) et taux de prédation du feuillage en 2004 pour les sites ayant des effectifs suffisants, soit VIS et STF. De plus, afin de mettre en évidence des corrélations entre le taux de mortalité et les variables écologiques, une ACP sur les variables écologiques des quadrats de démographie a été effectuée, avec le taux de mortalité par quadrat (ratio du nombre d'individus morts en 2005 / nombre d'individus germés en 2004) en variable supplémentaire.

Le taux de mortalité des plantules dépend uniquement de la taille des individus et non pas du milieu, ni du taux de prédation, ni du site (tableau 3.13), même si les tailles des plantules diffèrent entre sites dans chaque type de milieu : les individus les plus grands ont un taux de mortalité significativement plus faible que les individus de petite taille (figure 3.19). L'ACP confirme la déconnexion entre le milieu et le taux de mortalité : ce dernier n'est corrélé à aucun des axes de l'ACP, que ce soit en 2003 ou en 2005 (figure 3.20). Enfin, le poids des graines est corrélé significativement avec la surface foliaire des plantules (2004, expérimentation sur la dépression de consanguinité) que ce soit pour les graines issues d'allo-fécondations ou d'auto-fécondations (tableau 3.14).

Une grande variabilité spatiale du recrutement

Le taux de germination présente une grande variabilité, que ce soit entre les conditions naturelles et les conditions contrôlées (e.g. Isselstein *et al.* 2002, Clarke et Davison 2004), et entre milieux et entre microhabitats (e.g. Valverde et Silvertown 1995, Kery *et al.* 2000, Clarke et Davison 2004). Cinq facteurs peuvent contribuer à de telles variabilités :

- Le taux de prélèvement des graines. Il peut varier dans l'espace entre sites et entre habitats (comme vu dans le chapitre sur la dissémination des graines), avec un impact des rongeurs sur le prélèvement des graines plus important en milieu fermé qu'en milieu ouvert. Par ailleurs, il peut aussi varier à plus petite échelle, en fonction de la probabilité de découverte des graines.

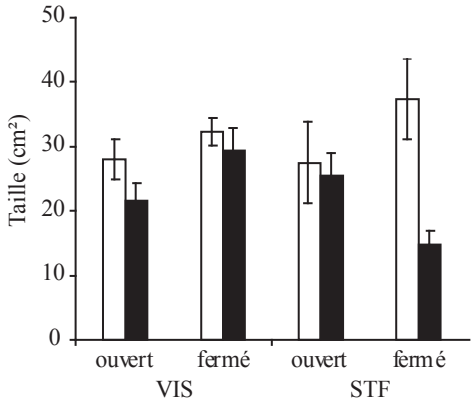


Figure 3.19. Taille des plantules (moyenne ± SE) en 2004 au PSL et à VIS en fonction de leur devenir en 2005 (survivant ou mort) en milieu ouvert et fermé.

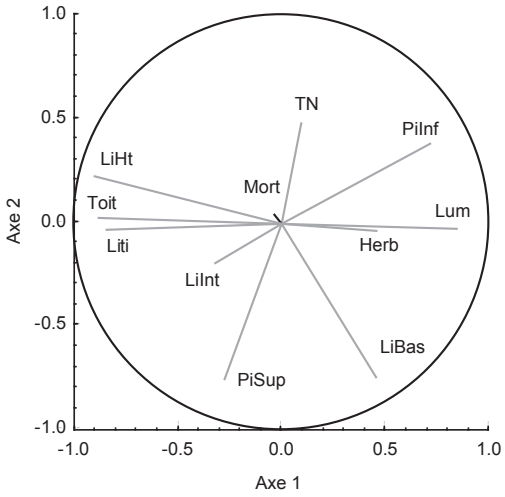


Figure 3.20. Cercle des corrélation de l'ACP avec les données écologiques (2003) des quadrats de suivi de démographie en variables principales (gris) et la mortalité des plantules sur ces quadrats (nombre de morts en 2005 / nombre de germinations en 2004) en variable supplémentaire (Mort, en noir). Le premier axe explique 42.1 % de la variance et correspond à la fermeture du milieu par les ligneux hauts, le deuxième axe explique 16.3 % de la variance et est un axe de qualité du sol et de fermeture par les ligneux bas. Le taux de mortalité n'est pas corrélé avec les deux premiers axes de l'ACP (axe 1 : rsp = -0.09, p = 0.555; axe 2 : rsp = 0.08, p = 553, n = 47).

graines issues de :	Variable	*n*	r_{Sp}	*p*
allo et autofécondations	hauteur	309	0.21	<0.001
	surface	309	0.50	<0.001
allofécondation	hauteur	212	0.20	0.003
	surface	212	0.61	<0.001
autofécondation	hauteur	97	0.22	0.030
	surface	97	0.50	<0.001

Tableau 3.14. Corrélations de Spearman entre le poids des graines et la taille des plantules à la fin de la première année de végétation (hauteur en cm et surface foliaire en cm²) dans l'expérimentation portant sur la dépression de consanguinité (cf chapitre système de reproduction).

- Le taux de viabilité des graines. Il peut différer entre sites à cause de différences génétiques (apparentement entre individus, dérive, …) (Menges 1990). Cependant, comme les graines plantées dans chaque site proviennent du site même, et que le même pool de graines a été utilisé en milieu ouvert et fermé, ce facteur ne peut expliquer les variations inter- et intra-habitat. Par ailleurs, aucun signe de dépression de consanguinité n'a été mis en évidence en conditions contrôlées, ce qui suggère que ce facteur n'est pas à l'origine des différences de taux de germination entre sites.

- Le taux d'attaque par les pathogènes (bactéries, champignons). Très peu d'études se sont intéressées à la variation spatiale des pathogènes et à leur impact sur les banques de graines (Kremer 1993, Facelli *et al.* 1999). Cependant, leur rôle ne peut être écarté, les communautés de pathogènes pouvant différer à la fois entre sites, entre habitats et à l'échelle intra-habitat.

- La durée de vie des graines dans la banque de graines. Nous avons fait l'hypothèse que toutes les graines germaient dans les 2 ans suivant leur enfouissement, cependant des graines pourraient germer plus tard et le temps passé dans la banque de graines pourrait différer entre sites ou entre milieux : ceci sera vérifié lors du suivi des placettes de semis.

- Les conditions du milieu, comme l'intensité lumineuse (Valverde et Silvertown 1995, Isselstein *et al.* 2002), les variations d'humidité et de température (e.g. colling 02, (Baskin et Baskin 1998, Budelsky et Galatowitsch 1999, El-Kassaby et Edwards 2001) peuvent avoir un effet important sur la germination. Ces trois facteurs diffèrent entre milieu ouvert et milieu fermé ; la réduction lumineuse en milieu fermé est supérieure à 90 % en juillet sur les sites étudiés et l'humidité du sol, la température, et leurs variations sont des facteurs différant fortement entre les zones boisées et les clairières (par exemple : humidité plus forte, températures moins contrastées en milieu fermé) (Collins *et al.* 1985, Matlack 1993).

Le fait que les graines plantées sous couvert sempervirent aient moins germé que celles sous couvert de décidus et que les taux de germination sous couvert de décidus aient été aussi élevés que ceux en milieu ouvert confortent l'hypothèse de différences de conditions de germination entre les deux types de milieu : au moment de la germination, les décidus n'ont pas encore débourré, et les conditions physiques de luminosité, température et humidité du sous-bois pourraient donc alors être assez proches de celles du milieu ouvert. En conclusion, même si les causes précises ne sont pas connues, le taux de germination en milieu fermé sous couvert sempervirent est très faible alors que celui sous couvert décidu est élevé et proche des taux de germination en milieu ouvert. Ceci va encore une fois dans le sens d'un meilleur fonctionnement des populations en milieu ouvert ou sous couvert décidu, et d'un impact négatif des couverts sempervirents.

Les taux de mortalité des plantules de *P. officinalis* présentent moins de sources de variabilité que les taux de germination. Dans cette étude, seule la taille des plantules a un impact sur leur mortalité, celle-ci dépendant des conditions biotiques et abiotiques et du poids des graines. Dans le chapitre sur la dynamique des populations, nous avons vu que le taux de mortalité diminuait au cours du développement du stade plantule au stade reproducteur, ce qui est typique des plantes pérennes ((Harper 1977, Horvitz et Schemske 1994, Oostermeijer *et al.* 1994). A une échelle plus

petite, au sein du stade Plantule, la mortalité diminue lorsque la taille des individus augmente, ce qui peut être dû au fait que les plantules de grande taille, qui ont une surface foliaire plus grande et donc de meilleures capacités d'acquisition des ressources et sans doute des réserves racinaires plus importantes (Hanzawa et Kalisz 1993, Worley *et al.* 2000), sont plus à même de tamponner les variations des niveaux de ressources. En région méditerranéenne, c'est la disponibilité en eau (en particulier pendant la sècheresse estivale) qui est souvent considérée comme le facteur ayant le plus d'impact sur la performance des individus (Hampe et Arroyo 2002, Riba *et al.* 2002). Cependant, les taux de mortalité des plantules ne diffèrent ni entre sites, ni entre milieux, ce qui est étonnant car les tailles des plantules diffèrent entre VIS et STF et les individus en sous-bois devraient avoir moins de réserves qu'en milieu ouvert à cause de la limitation en ressources lumineuses. Ceci pourrait s'expliquer par des compensations : en milieu fermé, les plantules sont plus petites et donc devraient avoir une mortalité plus forte mais les conditions en été sont moins stressantes qu'en milieu ouvert et vice-versa. Une expérimentation consistant à comparer croissance et survie de plantules en faisant varier la disponibilité en eau et l'ombrage n'a pas pu être mise en œuvre durant la thèse mais permettrait de confirmer ou d'infirmer cette compensation. Le fait que le poids des graines et la taille des plantules soient corrélés positivement (tableau 3.14) suggère qu'une part de la différence de taille entre sites pourrait être due à des différences de taille de graines, ce qui n'a pas été vérifié ici. Enfin, le taux de prédation n'a pas d'influence sur le taux de mortalité des plantules, ce qui peut être dû au fait qu'il est trop faible pour avoir un impact significatif. Ceci ne veut pas dire pour autant que la prédation n'a pas d'impact au cours de la vie de ces individus : comme on l'a vu au chapitre sur l'herbivorie, la prédation qui touche le stade juvénile pourrait se répercuter plus tard dans le cycle de vie, sur la croissance et la reproduction (Hanley et May 2006).

Le taux d'accroissement des populations est très peu sensible à la survie des plantules (élasticités à la survie des plantules : 0.0711-0.0014, selon le site et le milieu). Dans les populations de *P. officinalis*, la survie des adultes est très forte, et leur durée de vie, d'après des observations en jardin et les estimations résultant des modèles matriciels, est très longue (plusieurs décennies) : il semble que dans ce type de populations, le recrutement pourrait être suffisant même s'il n'était assuré que de manière épisodique (e.g. Menges et Dolan 1998). Le suivi à long terme de la démographie de cette espèce permettra de tester cette hypothèse qui est probable sous un climat à forte variabilité intra- et interannuelle des précipitations comme le climat méditerranéen.

Partie IV

Quelle gestion pour les espèces pérennes longévives ?

Lorsque les causes et les modalités de la raréfaction d'une espèce ont été identifiées, plusieurs questions se posent avant de mettre en place sa gestion : sur quelle unité de fonctionnement faut-il intervenir, la population ou la métapopulation? Et donc à quelle échelle du paysage ? Faut-il en priorité gérer l'habitat pour agir indirectement sur la dynamique des populations? Ou faut-il en priorité agir directement sur les effectifs des populations via des renforcements ou des réintroductions ? En effet, si une population ne réagit pas à la gestion du milieu, par exemple si ses effectifs ont été réduits en dessous d'un seuil ne permettant pas d'assurer sa viabilité, la création de nouvelles populations ou le renforcement des populations existantes permettront d'augmenter les effectifs et la diversité génétique des populations.

4.1 LA POPULATION, ÉLÉMENT DE GESTION PERTINENT

Les caractéristiques de la dissémination, le comportement des pollinisateurs et la distance actuelle entre les populations (figure 1.4) font d'une part que les flux de gènes entre populations de *P. officinalis* via les graines ou via le pollen sont très réduits, voire inexistants, et d'autre part que les évènements de colonisation de nouveaux sites sont très rares. De plus, la longévité de l'espèce et la survie très élevée des adultes suggèrent fortement que les taux d'extinction sont faibles. Ces caractéristiques sont celles d'une espèce dont les populations sont persistantes, à l'instar des espèces endémiques méditerranéennes (Thompson 2005), et non d'une espèce fonctionnant en métapopulation. Cependant, il est possible que chez les espèces longévives à faible fécondité, il existe bien une dynamique en métapopulation mais qui se produirait à une grande échelle temporelle (Ouborg et Eriksson 2004). Chez *P. officinalis*, il est possible que les flux de gènes entre populations aient été plus importants avant les changements d'utilisation des terres, lorsque les populations étaient moins isolées. Seules des études génétiques permettraient de connaître les relations passées et actuelles entre populations. Quoi qu'il en soit, les résultats de notre étude, basée sur une approche populationnelle des impacts de la variabilité spatiale du milieu, supportent le choix de la population comme élément pertinent de gestion.

4.2. QUELLE GESTION DU MILIEU ?

Gérer une population demande non seulement de considérer la biologie (comment obtenir la meilleure dynamique possible ?) mais aussi la mise en œuvre (qu'est-il réaliste de faire dans le contexte socio-économique actuel ?). Les analyses d'élasticité ont mis en évidence que le stade démographique contribuant le plus au taux d'accroissement des populations, et donc le stade sur lequel une action de gestion serait la plus efficace, est le stade "Végétatif 2" pour les populations

en décroissance, et le stade "Reproducteur" (et de façon moindre le stade "Végétatif 2") pour les populations en croissance. Plus précisément, il s'agit des paramètres de survie de ces stades et de la fécondité pour la population étudiée ayant la croissance la plus forte. Ces informations ne permettent pas en tant que telles de déterminer une stratégie de gestion du milieu : en effet, comment atteindre ces paramètres de survie et de fécondité ? L'intérêt de coupler l'étude de la dynamique des populations avec l'étude détaillée du cycle de vie et la gestion expérimentale apparaît ici clairement. L'analyse détaillée du cycle de vie a permis de mettre en évidence que la survie des individus et leur fécondité sont reliées positivement à leur taille. De plus, la gestion expérimentale à TAU a montré que la coupe des ligneux permettait non seulement d'augmenter la taille des individus et leur fécondité, comme il a déjà été montré Chez *Paeonia mascula* (Ne'eman 2003) et *Primula vulgaris* (Barkham 1992), mais aussi de retrouver une population en croissance. L'ouverture du milieu semble donc être une gestion appropriée. Dans le cas d'essences sempervirentes, la fermeture du milieu pose de sérieux problèmes (d'acquisition de ressources et de fécondité), mais celle par des caducifoliés n'a pas un impact fortement négatif. Les modalités de gestion vont donc différer dans les deux cas. Lorsque des essences sempervirentes sont en jeu (comme à PSL, STF, TAU), une ouverture du milieu est à envisager. En revanche, lorsque des essences caducifoliées sont en jeu (comme à VIS), une ouverture du milieu n'est pas nécessaire. Cependant, dans les populations où le sous-bois serait trop dense ou constitué de buissons sempervirents, une éclaircie de celui-ci pourrait être envisagée.

Une fois colonisé par des espèces ligneuses, trois méthodes peuvent permettre de ré-ouvrir un milieu. La première est une gestion par des feux contrôlés (e.g. Menges *et al.* 2006), mais en l'état des connaissances, cette modalité n'est pas envisageable pour la Pivoine officinale. En effet, l'impact du feu sur les individus n'est pas connu et dans de nombreux sites la végétation ligneuse est trop développée et inflammable pour que le feu soit facilement contrôlable sur un espace restreint. La deuxième mesure de gestion consiste à réaliser une coupe des ligneux et à mettre en place un contrôle de leur repousse par pâturage (e.g. Ehrlen *et al.* 2005). Cette solution est également difficile à mettre en œuvre, car les sites sont pauvres en espèces herbacées et une coupe manuelle des repousses des ligneux doit de toute manière être menée en parallèle du pâturage (Rousset et Lepart 1999). De plus, il faudrait s'assurer que le bétail n'attaque pas les Pivoines, or des études sur une espèce voisine (*P. broteroi*) indiquent le contraire (Sanchez-Lafuente *et al.* 1999, Sanchez-Lafuente 2002). Enfin, une troisième option consiste à réaliser des coupes régulières des arbres : ce type de gestion est proche des pratiques d'exploitation des taillis qui existaient avant les changements d'utilisation des terres dans la région d'étude. Cette technique est facile à mettre en œuvre et si les populations peuvent supporter des durées en milieu fermé qui coïncident avec le temps qu'il faut pour atteindre des taillis exploitables (c'est-à-dire environ 20 ans dans la région d'étude), la fréquence d'intervention sera faible et la valorisation du bois possible. Cette dernière option semblant la plus pertinente, des simulations de coupes ont donc été faites pour deux populations (TAU et STF) afin de déterminer l'impact d'une telle gestion du milieu.

Simulations de coupes

Les modèles démographiques peuvent permettre de simuler la répétition de perturbations ou d'interventions de gestion (e.g. Chapman *et al.* 1989, Cipollini *et al.* 1994, Pascarella et Horvitz 1998, Menges *et al.* 2006). Les modèles démographiques utilisés ici sont déterministes et ne sont pas prédictifs, et ne prennent pas en compte la densité-dépendance : s'ils ne peuvent donner des résultats quantitatifs (les effectifs), ils peuvent néanmoins donner des résultats qualitatifs sur les variations d'effectifs des populations. Ces modèles sont utilisés ici pour évaluer les variations d'effectifs induites par des coupes répétitives des arbres. Les deux sites choisis pour ces simulations sont ceux dont le milieu ouvert correspond à des coupes à blanc des ligneux (dans un taillis de Chêne vert à STF et dans une plantation de Sapin Douglas à TAU). Après une coupe, le milieu reste ouvert un certain temps puis se ferme peu à peu : le système est simplifié ici, en considérant que le milieu reste ouvert pendant x années après la coupe puis est fermé pendant y années. Un cycle de coupe, qui correspond à la durée entre deux coupes, est donc simulé pour chaque site en alternant x fois la matrice de transition du milieu ouvert et y fois celle du milieu fermé de ce site. Les effectifs de départ de ces simulations correspondent aux effectifs estimés à partir des recensements sur les transects. Les effectifs de de la banque de graines ont été estimés en se basant sur leur proportion dans la structure en stades stable de la population (cf. chapitre démographie). Des simulations de cycles de coupes d'une durée ($d = x + y$) de 2 à 30 ans ont été réalisées, et pour chaque type de cycle, toutes les combinaisons possibles d'alternances de milieu ouvert puis fermé ont été faites (allant de 1 année de milieu ouvert et $d - 1$ de milieu fermé, à $d - 1$ années de milieu ouvert à 1 année de milieu fermé), ce qui mime des vitesses de fermeture du milieu différentes. Les variations d'effectifs dans chaque stade morphologique ont été calculées sur une période de 100 ans.

A STF, le taux d'accroissement asymptotique est inférieur à 1 en milieu fermé et non significativement différent de 1 en milieu ouvert. Quelles que soient les durées des cycles et les combinaisons au sein des cycles, les effectifs dans chaque stade morphologique diminuent systématiquement. Cependant cette diminution est plus ou moins forte selon les combinaisons : elle est moindre pour les cycles de plus de 15 ans, avec 5-7 ans de milieu ouvert. A TAU, le taux d'accroissement asymptotique est inférieur à 1 en milieu fermé et très supérieur à 1 en milieu ouvert. Lorsque l'on simule les cycles de coupes, les effectifs augmentent s'il existe un nombre minimal d'années de milieu ouvert consécutives, qui dépend de la durée du cycle : plus de 1 an de milieu ouvert pour les cycles de 4 à 8 ans, de 2 ans pour les cycles de 9 à 16 ans, de 3 ans pour les cycles de 17 à 24 ans et de 5 ans pour les cycles de 25 à 30. Ces durées sont inférieures au temps qu'il faut pour que le milieu se ferme dans la région d'étude : quelles que soient les modalités des coupes, les effectifs de la population augmentent.

Deux réponses différentes aux cycles de coupes

Les analyses de la dynamique des populations mettent en évidence que les milieux ouverts dans la partie sud de l'aire de distribution (PSL) et les milieux fermés par des essences sempervirentes (PSL, TAU, STF) ne sont pas favorables actuellement aux populations de Pivoines. Les simulations

suggèrent que la réponse d'une population à des cycles de coupes dépend de sa dynamique en milieu ouvert.

A TAU, où le taux d'accroissement des populations est >1 en milieu ouvert, la réponse aux coupes est positive et la population croît quelle que soit la durée du cycle de coupes. Dans des populations de même type, c'est-à-dire des populations ayant un taux de croissance fort en milieu ouvert, un mode de gestion simple, consistant à faire des coupes régulières, serait efficace. L'expérimentation de gestion semble confirmer ce résultat, mais il faut néanmoins attendre encore plusieurs années pour vérifier que le recrutement est effectif. Par ailleurs, les simulations indiquent que la population peut croître même avec des temps entre deux coupes relativement longs (supérieurs à 20 ans), ce qui est compatible avec une valorisation du bois de coupe et contribuerait à rendre économiquement viable une telle gestion. Par contre, à STF où le taux d'accroissement en milieu ouvert est égal à 1 (mais à la limite de la significativité), les effectifs de la population décroissent quels que soient les cycles de coupes. Ceci indique que l'alternance de milieu ouvert et fermé n'est pas une gestion appropriée lorsque le milieu ouvert n'est pas ou peu favorable.

Sachant que les lisières semblent être les zones les plus favorables dans la population en limite sud d'aire de répartition, le mode de gestion pertinent pourrait consister à maximiser l'hétérogénéité spatio-temporelle du milieu afin de créer de nombreuses lisières (cf. annexe 2.1). Ceci est possible en procédant à des coupes par révolution : la parcelle est séparée en plusieurs zones, chacune étant coupée cycliquement avec une date de première coupe différente selon la zone. Le résultat est une mosaïque de zones à des stades successionnels différents. Ce mode de gestion est contraignant car il nécessite une fréquence d'intervention plus élevée que des coupes simples, et une quantité de bois exploitable faible à chaque coupe. Une autre stratégie pourrait consister à faire des coupes des essences sempervirentes tout en laissant systématiquement les essences caducifoliées (arbres et buissons), sous lesquelles sont en général regroupées les Pivoines. Il serait particulièrement intéressant de tester l'hypothèse de la maximisation de l'hétérogénéité du milieu à STF, en comparant l'évolution de parties de la population après une coupe simple ou après une coupe plus complexe (laisser les feuillus ou créer des lisières), et de confronter les résultats à ceux des modèles, comme pour TAU. Après plusieurs années de suivi, la prise en compte des stochasticités environnementales et démographiques devrait permettre d'affiner ces résultats et de faire des analyses de viabilité des populations.

4. 3 RÉINTRODUCTIONS ET RENFORCEMENTS

Il y a peu d'individus reproducteurs dans les populations de *P. officinalis* étudiées, mais il reste encore un gros réservoir d'individus végétatifs en milieu fermé. Si une gestion des populations est entreprise rapidement, retrouver des populations avec des effectifs importants est encore possible. Par contre, si aucune gestion n'est entreprise, les parties des populations en sous-bois (c'est-à-dire la majeure partie des populations) pourraient décliner rapidement : en effet, la fermeture du milieu ayant débuté dans les années 1950, le nombre d'années durant lesquels les individus sont restés

en sous-bois est en passe de dépasser leur durée de vie (estimée à plusieurs dizaines d'années). Or, les populations à faibles effectifs et isolées sont particulièrement sensibles aux stochasticités environnementale, démographique et génétique, et leur probabilité d'extinction est élevée. Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les caractéristiques de la biologie de la reproduction de la Pivoine officinale devraient lui permettre d'être peu sensible à des réductions d'effectifs. Les taux de recrutement de cette espèce étant faibles et les temps de génération très longs, réintroduire des individus permettrait de retrouver rapidement des effectifs élevés. De plus, *P. officinalis* ayant des capacités de dissémination très réduites, des réintroductions seraient le seul moyen d'augmenter le nombre de populations. Les contraintes de ce type de gestion sont importantes, car leur efficacité dépend à la fois de la connaissance précise de la niche de régénération de l'espèce, mais aussi celle du fonctionnement des populations au niveau local et régional, en particulier des flux de gènes entre et au sein des populations (Montalvo *et al.* 1997). Les réintroductions étant très souvent faites dans l'urgence, ces connaissances sont souvent très fragmentaires, expliquant leur faible taux de réussite (Maunder 1992, Hodder et Bullock 1997, Milton *et al.* 1999, Jusaitis *et al.* 2004). Trois points principaux doivent être abordés pour définir les modalités des réintroductions, en considérant à la fois la biologie de l'espèce et la mise en œuvre de la gestion :

- Faut il réintroduire des graines ou des juvéniles? Chez les plantes pérennes longévives comme la Pivoine officinale, le taux d'accroissement des populations est plus sensible à la survie des individus juvéniles et adultes qu'à la survie des stades antérieurs et à la fécondité. Par ailleurs, les taux de mortalité des premiers stades (graines et plantules) sont plus élevés que ceux des stades avancés et particulièrement fortes. Ceci indique que la réintroduction d'individus déjà âgés serait plus efficace que la plantation de graines, non seulement en nombre d'individus atteignant l'âge adulte mais en qualité de ces individus (Jusaitis *et al.* 2004). Cependant, dans le cas de la Pivoine officinale, les zones où se trouvent les individus sont accidentées et très caillouteuses ; planter les individus dans ce type de sol est laborieux et la probabilité de reprise des transplants dans ce type de sol, sans possibilité d'arrosage, est probablement faible. Il est donc beaucoup plus simple de planter des graines que de planter des stades plus avancés : le choix est déterminé par des considérations pratiques.

- Combien d'individus réintroduire ? L'objectif est d'obtenir une population viable, et donc un effectif efficace suffisant, ce qui est à définir espèce par espèce. Les taux de recrutement des plantules *in natura* étant faibles chez les espèces pérennes longévives, le nombre de graines à réintroduire devra être consistant. Le facteur limitant sera donc le nombre de graines maximum qu'il est possible de prélever dans une population, ce qui dépendra de l'élasticité du taux d'accroissement asymptotique aux variations du nombre de graines. Dans le cas de la Pivoine, si on considère les populations en croissance, les élasticités du taux d'accroissement à la fécondité sont de 0,06 – 0,16, ce qui signifie qu'un prélèvement de 10 % des graines aura un impact de 0,6 – 1,6 % sur le taux d'accroissement de la population, ce qui est minime. Il est donc envisageable de prélever 50 % de graines pour cette espèce et dans les populations en croissance, d'autant plus que cette espèce est pérenne et qu'une chute de recrutement une année donnée n'a pas un gros impact sur sa dynamique.

- Dans quelle(s) population(s) prélever les graines à réintroduire? Les renforcements et réintroductions sont de plus en plus utilisés et des questions liées à l'impact de ces modifications des flux de gènes entre populations à court et long terme émergent (Storfer 1999, Hufford et Mazer 2003, Kawecki et Ebert 2004, McKay *et al.* 2005). Si la population devant être renforcée est menacée par l'augmentation de l'apparentement entre individus et la dérive génétique (Ellstrand et Elam 1993), l'augmentation des flux de gènes entre populations causée par les réintroductions peut avoir des effets positifs en augmentant la diversité génétique ou l'hétérozygotie (e.g. Vergeer *et al.* 2003). Dans ces cas-là, un mélange de graines provenant de plusieurs populations peut être envisagé. Par contre, si les populations sont adaptées localement, ce qui est probable chez les espèces telles *P. officinalis*, qui ont des populations très persistantes et des capacités de dissémination faibles, l'augmentation des flux de gènes peut conduire à de la dépression d'allofécondation (Waser *et al.* 2000). Le fait que la Pivoine officinale présente un système d'auto-incompatibilité plaide pour l'introduction de graines provenant d'origines différentes pour augmenter le nombre d'allèles d'auto-incompatibilité. Cependant, le risque de dépression d'allo-fécondation ne pourra être évalué qu'à partir d'expérimentations, et nécessite donc une étude approfondie.

Les connaissances à acquérir et la difficulté de la gestion des populations à faibles effectifs mettent en évidence l'intérêt d'intervenir au début du processus de raréfaction, lorsqu'une gestion de l'habitat est suffisante pour conserver les populations.

Partie V

Conclusions et perspectives

La compréhension des causes et des modalités du déclin des espèces est le point clé de la biologie de la conservation (Caughley 1994, Horvitz et Schemske 1995). La progression forestière, consécutive aux changements d'utilisation des terres ou à des perturbations naturelles, par succession secondaire ou reforestation, concerne une grande partie de l'Europe et le Nord du bassin méditerranéen. Cependant, malgré son importance, ses conséquences sur la biologie et la dynamique des espèces végétales de clairières ou de milieu ouvert sont rares et ne concernent qu'un faible nombre d'espèces comme *Narcissus pseudonarcissus* (Barkham 1980, 1980, 1992, 1992), *Primula vulgaris* (Valverde et Silvertown 1998), *Calathea ovandensis* (Horvitz et Schemske 1995) *Linderia benzoin* (Cipollini *et al.* 1994) et *Cynoglossum virginianum* (Cipollini *et al.* 1993). L'objectif de cette thèse était de déterminer quels sont les mécanismes cruciaux dans la dynamique des populations des espèces végétales en milieu hétérogène et changeant. Plus précisément, par l'étude d'une espèce pérenne modèle, *P. officinalis,* elle a permis de quantifier les conséquences de la fermeture forestière sur le fonctionnement des populations d'espèces rares de milieux ouverts.

5.1. IMPACT DE LA FERMETURE FORESTIÈRE

La fermeture forestière a un impact négatif sur la majorité des stades du cycle de vie de la Pivoine officinale. Elle provoque une limitation de l'acquisition des ressources principalement en réduisant de façon très importante la quantité de lumière incidente. Cette limitation est telle qu'elle induit une diminution de la taille des individus, et non simplement un ralentissement de leur croissance (cf. expérimentation d'ombrage des individus) (Barkham 1980, 1980, Whale 1984, Knox 1997), ce qui affecte la dynamique et la structure démographique des populations de deux manières :

- les **trajets dans le cycle de vie** des individus : en milieu fermé ils restent plus longtemps en stase dans les stades végétatifs, régressent plus vers les stades inférieurs et progressent moins vers les stades supérieurs. Ce patron concorde avec celui détecté chez une autre herbacée pérenne, *Aechmea magdalenae* (Ticktin et Nantel 2004), entre les populations des sous-bois de forêts anciennes et de forêts secondaires, ce qui a été attribué à des différences de ressources lumineuses (les forêts secondaires sont caractérisées par une canopée moins dense).

- la **reproduction**, et notamment (1) les probabilités de floraison et les fréquences de floraison, (2) la reproduction potentielle, i.e. le nombre de fleurs et d'ovules produits et (3) la fécondité, i.e. la production de graines, sont plus faibles en milieu fermé qu'en milieu ouvert. Ces trois points ont été observés chez d'autres espèces (Barkham 1980, 1980, Cipollini et al. 1994, Knox 1997, Valverde et Silvertown 1998). L'analyse fine des allocations des ressources à la reproduction a permis de relier ces trois points à la taille des individus, et de mettre en

évidence qu'une partie de la diminution de la production de graines en milieu fermé était due à une allocation plus faible à la fonction femelle chez les individus de petite taille. Par ailleurs, il ne semble pas que la fécondité soit limitée par les évènements de reproduction antérieurs (pas de coût en terme de reproduction future), ce qui ne va donc pas handicaper les individus en milieu ouvert qui ont une fécondité plus importante. Notre étude est cependant trop courte pour détecter des coûts en terme de survie chez cette espèce longévive.

La fermeture forestière modifie l'impact des prédateurs, mais ne semble pas affecter l'activité des pollinisateurs. La **prédation des graines** mûres, en particulier par les rongeurs, est marquée en milieu fermé, mais quasi nulle en milieu ouvert, alors que les **taux d'herbivorie** sont plus élevés en milieu ouvert, tout en restant en général faibles, sauf chez les plantules. Par contre la **pollinisation** est aussi efficace en milieu ouvert que fermé (tout au moins dans le cas des essences caducifoliées).

Enfin, la fermeture du milieu affecte la régénération au travers des **taux de germination** qui, même s'ils présentent une forte variabilité au sein de chaque milieu, sont plus faibles en milieu fermé comme observé chez des espèces de clairières (Valverde et Silvertown 1995, Morgan 1997, Batlla *et al.* 2000). Cette différence est en partie due à une plus forte prédation des graines et vraisemblablement à des conditions qui ne sont pas optimales pour la germination en milieu fermé. La **survie des plantules**, qui est faible, ne diffère pas entre milieux.

En conséquence, la structure démographique en milieu fermé est composée à la fois d'une proportion de reproducteurs et de plantules inférieure et d'une proportion d'individus végétatifs supérieure à celle en milieu ouvert. Les paramètres démographiques qui intègrent la fécondité, la survie et le trajet des individus dans le cycle démographique diffèrent donc selon le milieu : les valeurs reproductives et les taux de reproduction nets (R_0) sont plus faibles et les temps de génération plus longs en milieu fermé qu'en milieu ouvert.

5.2. TROIS APPROCHES COMPLÉMENTAIRES : DYNAMIQUE, CYCLE DE VIE ET GESTION EXPÉRIMENTALE

En 1994, Schemske *et al.* ont attiré l'attention sur le fait que les études en biologie de la conservation devaient permettre : (1) d'évaluer le statut des espèces rares et menacées, c'est-à-dire si les effectifs sont stables, en augmentation ou en diminution, (2) d'identifier les stades du cycle de vie et les paramètres démographiques critiques, c'est-à-dire ceux affectant le plus la croissance et la persistance des populations, et (3) d'identifier les causes biologiques de la variations de ces stades et paramètres. Cette étude a intégré ces trois recommandations et a permis d'explorer à la fois l'impact des changements de l'environnement sur la dynamique des populations et sur la majorité des composantes du cycle de vie de l'espèce modèle (y compris ses interactions avec les pollinisateurs et les prédateurs), mais aussi de développer une expérimentation permettant de tester la réponse de l'espèce étudiée à un mode de gestion. La combinaison de ces trois points dans une même étude permet de mettre en évidence leur parfaite complémentarité, et le fait que chacun est

nécessaire pour éviter des erreurs d'interprétation:

- L'analyse de la dynamique des populations permet d'identifier les paramètres démographiques ou les stades qui contribuent le plus aux variations du taux d'accroissement et ceux sur lesquels une action de gestion aurait le plus d'efficacité (Silvertown *et al.* 1996, Ehrlen et Van Groenendael 1998, Caswell 2000, de Kroon *et al.* 2000). Par ailleurs, ces analyses ne permettent pas de déterminer s'il est possible de faire varier ces paramètres (Ehrlen *et al.* 2005), et de plus les paramètres démographiques qui contribuent le plus au taux d'accroissement des populations sont généralement ceux qui présentent le moins de variabilité et vice-versa (Pfister 1998), ce qui a aussi été vérifié pour *P. officinalis*. De plus, si ces analyses permettent d'identifier quels paramètres varient (Caswell 2000), comme ici entre milieux ouvert et fermé, elles ne perment pas de connaître les mécanismes à l'origine de cette variabilité.

- L'analyse du cycle de vie permet de mettre en évidence les mécanismes induisant des variations des paramètres démographiques entre habitats (Valverde et Silvertown 1995) : par exemple, elle a mis ici en évidence que la faible fécondité des individus en milieu fermé était due à la taille réduite des individus et non à un déficit de pollinisation. Par contre, elle ne permet pas de savoir si ces variations ont des conséquences démographiques : ainsi, si la fécondité varie beaucoup entre les populations de Pivoines en milieu fermé et en milieu ouvert, elle contribue peu aux variations de leur taux d'accroissement. L'analyse du cycle de vie permet aussi d'évaluer les risques auxquels sont soumises les populations fragmentées à travers l'étude de la biologie de la reproduction et des interactions avec les prédateurs, disséminateurs et pollinisateurs.

- La gestion expérimentale met en évidence les stades et paramètres démographiques sur lesquels il est possible d'agir (Ehrlen *et al.* 2005). Elle permet aussi de valider les prédictions des modèles, qui par définition ne peuvent prendre en compte toutes les sources de variabilité et la complexité des systèmes naturels.

Cette étude a donc permis de relier les variations environnementales induites par les changements d'utilisation des terres aux traits d'histoire de vie de *P.officinalis* et aux interactions avec les pollinisateurs et les prédateurs. Elle est originale car elle prend en compte à la fois la dynamique des populations, une partie du cycle de vie, mais aussi la gestion expérimentale. Or, si il y a de plus en plus d'études sur les conséquences des variations d'une des composantes du cycle de vie sur la dynamique des populations, par exemple l'herbivorie (Bastrenta *et al.* 1995, Garcia et Ehrlen 2002), peu d'études sur les espèces rares combinent au moins deux des trois points précédemment décrits sur une partie plus conséquente du cycle de vie. On peut citer ici les études sur *Narcissus pseudonarcissus* (Barkham 1980, 1980, 1992, 1992), *Gentiana pneumonanthe* (Chapman *et al.* 1989, Oostermeijer *et al.* 1994, Krenova et Leps 1996, Oostermeijer *et al.* 1996, Oostermeijer *et al.* 1998), *Primula vulgaris* (Valverde et Silvertown 1995, 1997, 1998), *Centaurea corymbosa* (Colas *et al.* 2001, Freville *et al.* 2004, Riba *et al.* 2005). Pourtant, si le modèle biologique est choisi avec soin, prendre en compte ces trois points est possible, même sur une durée relativement courte comme dans cette thèse. Ici, *P. officinalis* a été choisie car non seulement elle possède des traits d'histoire de vie typiques des géophytes pérennes menacées par la progression forestière, mais aussi des

caractéristiques faisant d'elle une espèce facile à manipuler (peu de fleurs, graines de grosse taille, individus facilement identifiables, …).

5.3. L'IMPORTANCE DES SOURCES DE VARIABILITÉ

Les espèces dont les individus ont une longue espérance de vie constituent la majorité des espèces végétales (Ehrlen et Lehtila 2002). Or, estimer la viabilité de leurs populations semble difficile en pratique : étant donné leur longue durée de vie, les projections ne peuvent se faire que sur un nombre limité de générations. Cependant, intégrer les sources de variabilité dans les modèles démographiques permettra d'affiner les projections et estimations de la viabilité des populations (Fieberg et Ellner 2001). Des prédictions plus fiables peuvent être obtenues en augmentant les connaissances sur le fonctionnement des populations (Menges 2000, 2000, Reed *et al.* 2002), comme les variabilités inter-annuelles, les caractéristiques génétiques (Reed et Frankham 2003), la structuration spatiale de l'habitat et la dissémination (Kindvall 2000).

5.3.1. La variabilité spatiale

Alors que la variabilité spatiale est à l'origine de grandes différences de dynamique entre les populations, en particulier des patrons d'élasticité (Oostermeijer *et al.* 1996, Valverde et Silvertown 1998), la majorité des études considèrent un faible nombre de populations (Menges 2000). L'étude présentée ici a porté sur 4 populations, chacune comportant deux types de milieu, ce qui a permis de considérer plusieurs sources de variabilité spatiale :

Variabilité de la réponse selon le type de fermeture forestière

L'impact de la fermeture forestière par des essences sempervirentes semble plus marqué que celui causé par des essences caducifoliées : la population sous couvert caducifolié (VIS) est en croissance, alors que les populations sous couvert sempervirent sont en décroissance (TAU, PSL, STF). Ce contraste peut s'expliquer d'une part parce que certaines composantes du cycle de vie ne sont pas affectées par une fermeture par des essences caducifoliées (les taux de germination des graines sont aussi élevés qu'en milieu ouvert et il n'y a pas de limitation de la pollinisation), et d'autre part parce que l'intensité de l'impact semble moins fort (meilleure fécondité que les individus en milieu fermé par les sempervirents, transitions des stades végétatifs au stade reproducteur plus élevées). Des études précédentes ont montré que la dynamique des populations et la fécondité pouvaient dépendre de la taille des clairières, et donc de l'intensité de la réduction de la lumière (Valverde et Silvertown 1995, 1998). La variation des impacts de la fermeture forestière mise en évidence pour *P. officinalis* est vraisemblablement due à une limitation en lumière moins sévère sous les arbres caducifoliés que sous les sempervirents: Cette hypothèse doit être vérifiée en étudiant plusieurs populations sous couvert de caducifoliés.

Variabilité de la dynamique en milieu ouvert : importance des populations en limite d'aire

La moitié des populations étudiées en milieu ouvert est en décroissance ou proche de la décroissance (STF, PSL). Celles-ci correspondent aux sites dont le climat est le plus chaud et sec, et où la fécondité y est plus faible que dans les sites plus au nord (cf. valeurs des paramètres démographiques annexe 1). La variabilité de la dynamique en milieu ouvert (en fonction de la sévérité climatique), couplée à la variabilité de la dynamique en milieu fermé (en fonction des essences présentes) peut expliquer pourquoi, alors que la fermeture forestière a des impacts négatifs sur la majorité des composantes du cycle de vie, elle ne se traduit pas systématiquement par une différence de taux d'accroissement entre milieux ouvert et fermé. La population dont le taux d'accroissement et les effectifs sont les plus faibles est une population périphérique, en limite sud d'aire de distribution (PSL). Les populations périphériques se trouvent en général dans des conditions écologiques différentes et peuvent être plus isolées que les populations du centre de l'aire de distribution : leurs effectifs sont donc souvent plus faibles et plus variables et elles échangent moins de gènes avec les autres populations (Vucetich et Waite 2003, Gapare *et al.* 2005, Guo *et al.* 2005). La dérive génétique et l'adaptation locale font qu'elles peuvent avoir une diversité génétique plus faible que les populations centrales mais peuvent posséder des allèles rares (Gapare *et al.* 2005) et donc être des écotypes remarquables. Ainsi, leur risque d'extinction élevé couplé à leur important potentiel évolutif font que ces populations sont particulièrement importantes à conserver (Hampe et Petit 2005, Thompson 2005).

Le rôle des lisières

Il existe de nombreuses études mettant en évidence des variations d'abondances au niveau des lisières entre deux ou plusieurs habitats. Le sens de ces variations dépend principalement des variations de facteurs abiotiques comme l'humidité ou la lumière (Matlack 1993, Chen *et al.* 1995, Cadenasso *et al.* 1997) ou biotiques comme les flux de propagules (Cadenasso et Pickett 2001), mais dépend aussi des modifications des interactions inter-spécifiques (Jules et Rathcke 1999). Dans le cas de *P. officinalis*, un effet positif des lisières dans le fonctionnement des populations est suggéré à deux niveaux : (1) les lisères semblent être le lieu le plus favorable pour initier un évènement de dissémination des graines (qui sont produites principalement en milieu ouvert) par les rongeurs (qui sont présents principalement en milieu fermé) et (2) la structure démographique au PSL suggère que la lisière serait plus favorable au fonctionnement de la population que les milieux fermé et ouvert pour les populations en limite sud d'aire de répartition (plus d'individus reproducteurs et de plantules, densité des individus plus forte) (cf. annexe 2.1). Une telle réponse à la présence des lisières est prédite lorsque les deux habitats de part et d'autre de la lisière diffèrent par leur favorabilité et que leurs ressources sont complémentaires (Ries *et al.* 2004, Ries et Sisk 2004). Ici, le milieu ouvert n'est pas limité par les ressources lumineuses mais le stress hydrique en été y est probablement important (températures élevées). Le milieu fermé est limitant en lumière mais les températures en été sont moins élevées : la lisère combine donc ces deux ressources complémentaires. Ce type de réponse a déjà été détecté chez les animaux (e.g. Ries 04 oiseaux) mais

rarement chez les plantes (Euskirchen *et al.* 2001). Quantifier l'impact des lisières et de l'hétérogénéité du milieu sur le cycle de vie et la dynamique est maintenant nécessaire. Une expérimentation sur la facilitation pourrait aussi être mise en place, en particulier une expérimentation en conditions contrôlées permettant de faire varier un facteur disponibilité en eau et un facteur ombrage, ainsi qu'une expérimentation *in natura* consistant à faire des semis ou des plantations de juvéniles sur des transects perpendiculaires aux lisières. L'impact des lisières et de l'hétérogénéité du milieu pourrait aussi être abordé par le biais d'expérimentations de gestion, en particulier comparer des coupes à blanc, des coupes permettant de maximiser l'hétérogénéité du milieu et des coupes sélectives des ligneux sempervirents, particulièrement dans les populations où le milieu ouvert est contraignant.

5.3.2. La variabilité temporelle

Les suivis démographiques d'espèces pérennes longévives doivent être menés sur des périodes longues afin de capturer toute la variabilité temporelle des paramètres démographiques (Lindborg et Ehrlen 2002) or la majorité de ces études concernent des périodes de suivi de moins de 5 ans (Menges 2000). En trois ans, l'étude sur *P. officinalis* a permis d'acquérir de nombreuses connaissances sur la dynamique et la biologie du modèle d'étude. Cependant, le suivi démographique n'est qu'à son début et a été initié en vue d'un suivi à long terme qui permettra de prendre en compte les variations inter-annuelles.

Par ailleurs, nos résultats indiquent que les réponses à la fermeture et à l'ouverture du milieu ne sont vraiment perceptibles que deux ans après les modifications du milieu. L'utilisation de modèles basés sur des chaînes de Markov d'ordre 2 permettrait de lier les effectifs au temps *t* à ceux au temps *t-2* et non *t-1* comme dans cette étude. Ces modèles seraient particulièrement intéressants pour les espèces qui présentent un délai de réponse aux changements environnementaux et donc pour les géophytes ayant des organes de réserves (Ehrlen 2000).

5.3.3. Fragmentation et risques d'extinctions locales

La progression forestière a un impact sur la qualité de l'habitat mais aussi sur la structure spatiale des populations : les populations de Pivoines sont maintenant séparées par une matrice constituée de ligneux. Comme la majeure partie des individus se trouve actuellement en milieu fermé, il est probable que les populations subissent des réductions d'effectifs importantes si leur gestion n'est pas rapidement entreprise. Dans les populations à faibles effectifs, deux stochasticités doivent être prises en compte :

- La stochasticité génétique peut avoir des conséquences importantes sur les populations d'espèces possédant un système d'auto-incompatibilité (Luijten *et al.* 2002) mais cet impact n'est perceptible qu'après de très importantes réductions d'effectifs (Willi *et al.* 2005). Par ailleurs, aucune dépression de consanguinité n'a été détectée chez *P. officinalis,* ce qui indique que l'augmentation de l'apparentement n'est pas un risque important. Il ne semble donc pas nécessaire de prendre en compte cette stochasticité pour la Pivoine officinale.

- La fragmentation peut avoir des conséquences non seulement sur la persistance mais aussi sur la colonisation de nouveaux sites favorables (Jacquemyn *et al.* 2002). La dissémination de *P. officinalis* est très fortement limitée dans l'espace (barochorie) : les évènements de colonisation de nouveaux sites favorables sont donc très peu probables, d'autant plus si la proportion de sites non favorables (c'est-à-dire ici de milieu fermé) augmente. Il ne semble donc pas pertinent d'inclure la dissémination dans les modèles démographiques (e.g. Cipollini *et al.* 1993, Cipollini *et al.* 1994).

- La stochasticité démographique peut avoir un impact sur les populations de faible effectif, sur des paramètres démographiques différents de ceux de la stochasticité environnementale (Jongejans et De Kroon 2005) et devra être prise en compte dans les modèles.

5.4. LES PLANTES PÉRENNES LONGÉVIVES ET LA NICHE DE PERSISTANCE

Cette étude a permis de confirmer les stratégies des espèces pérennes face à l'hétérogénéité spatio-temporelle du milieu. Les plantes étant des organismes sessiles, deux stratégies leur permettent de faire face à des dégradations des conditions environnementales : soit atteindre de nouveaux sites favorables grâce à la dispersion de propagules, soit attendre le retour des conditions favorables. Cette attente peut prendre plusieurs formes : une banque de graines (Stocklin et Fischer 1999), la persistance des individus adultes grâce à une reproduction clonale (Guardia *et al.* 2000), le rejet de souche (Bond et Midgley 2001), ou une survie adulte élevée (Pierson et Turner 1998, Garcia 2003, Nicole *et al.* 2005). La théorie des traits d'histoire de vie postule l'existence de compensations entre traits : les espèces peuvent donc être classées sur un gradient allant de celles qui investissent principalement dans la reproduction et peu dans la survie à celles dont les individus sont longévifs et investissent peu dans la reproduction (âge de maturité tardif, production de descendants faible). Chez les espèces ayant une longue durée de vie et une survie des adultes très élevée, les analyses de dynamique des populations ont mis en évidence que le taux d'accroissement des populations est très sensible à la survie des individus adultes, mais très peu sensible à la fécondité et à la survie des individus dans les premiers stades de la vie (plantules) (Silvertown *et al.* 1993, Svensson *et al.* 1993, Cipollini *et al.* 1994, Oostermeijer *et al.* 1996, Valverde et Silvertown 1998, Ehrlen *et al.* 2005), ce qui est aussi le cas pour *P. officinalis*. Une survie adulte élevée et une longue durée de vie des individus confèrent aux populations une stabilité face aux changements de l'habitat (Summerfield 1972, Eriksson 1996, Garcia et Zamora 2003, Garcia 2003), c'est à dire une longue persistance après ces changements leur permettant d'attendre un retour de conditions favorables. La partie du cycle de vie allant de la production des graines à l'établissement des plantules est critique pour la régénération (Harper 1977). Cependant, chez les espèces longévives, la niche de persistance (c'est-à-dire qui permet la meilleure survie adulte) semble aussi être un point clef de la régénération (Bond et Midgley 2001) : elle doit donc être la cible des actions de gestion.

Paeonia officinalis fait partie de ce type d'espèces (les individus pouvant survivre plusieurs dizaines d'années en milieu fermé d'après le calcul des espérances de vie). Lorsque le milieu se

ferme, les individus cessent de fleurir et régressent vers des stades végétatifs ayant une survie élevée. Le fait que cette réponse soit rapide (cf. expérimentation d'ombrage) et que la réponse à la réouverture du milieu le soit aussi (la population retrouve une dynamique typique des populations en milieu ouvert 2 ans après la réouverture du milieu) pourrait permettre à cette espèce de tirer profit des ouvertures du milieu tout en limitant les pertes lors de périodes relativement longues de fermeture du milieu. Ces caractéristiques pourraient donc permettre à cette espèce de répondre à la dynamique des clairières (chablis) et aux fluctuations des lisières (dépendantes des interactions entre hétérogénéité édaphique et variation climatique). Ainsi, lorsque le milieu se ferme, le paramètre influant le plus la croissance de la population est la survie des stades végétatifs. Lorsque le milieu s'ouvre, la survie des individus reproducteurs et la fécondité jouent un rôle de plus en plus important. De tels changements ont aussi été détectés chez deux autres espèces (Oostermeijer *et al.* 1996, Valverde et Silvertown 1998). Cette plasticité permettrait d'exploiter l'hétérogénéité spatiale mais aussi temporelle du milieu (Garcia et Zamora 2003). Cette plasticité pourrait être adaptative chez les espèces se trouvant dans des milieux caractérisés par une forte hétérogénéité spatio-temporelle et /ou se trouvant dans des régions dont l'histoire est caractérisée par des cycles d'expansion et de contraction de l'aire de distribution des espèces, comme la région méditerranéenne. Il serait maintenant en effet intéressant de pouvoir comparer l'impact de la fermeture forestière sur les espèces pérennes longévives dont la dynamique est locale, l'impact sur les espèces pérennes ayant des banques de graines et l'impact sur les espèces ayant des capacités de dissémination élevées et dont la dynamique est régionale.

Adams, V.M., Marsh, D.M. et Knox, J.S. (2005) Importance of the seed bank for population viability and population monitoring in a threatened wetland herb. *Biological Conservation*, 124, 425-436.

Agrawal, A.A. (1998) Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science*, 279, 1201-1202.

Agren, J. et Willson, M.F. (1994) Cost of seed production in the perennial herbs *Geranium maculatum* and *G. sylvaticum* - an experimental field-study. *Oikos*, 70, 35-42.

Alcantara, J.M., Rey, P.J., Sanchez-Lafuente, A.M. et Valera, F. (2000) Early effects of rodent post-dispersal seed predation on the outcome of the plant-seed disperser interaction. *Oikos*, 88, 362-370.

Alcantara, J.M., Rey, P.J., Valera, F. et Sanchez-Lafuente, A.M. (2000) Factors shaping the seedfall pattern of a bird-dispersed plant. *Ecology*, 81, 1937-1950.

André, M.F. (1998) Depopulation, land-use change and transformation in the French Massif Central. *Ambio*, 27, 351-353.

Andrieu, E., Debussche, M. et Thompson, J.D. (2006) The impact of forest spread on a marginal population of a protected peony (*Paeonia officinalis* L.): the importance of conserving the habitat mosaic. *Biodiversity and Conservation*, (in press).

Armbruster, P. et Reed, D.H. (2005) Inbreeding depression in benign and stressful environments. *Heredity*, 95, 235-242.

Ashman, T.-L. et Schoen, D.J. (1994) How long should flowers live? *Nature*, 371, 788-791.

Ashman, T.-L. et Schoen, D.J. (1996). Floral longevity: fitness consequences and resource costs. In *Floral Biology. Studies on floral evolution in animal-pollinated plants* (eds D.G. Lloyd et S.C.H. Barett), pp. 112-139. Chapman Hall, New York.

Ashman, T.L. (1992) Indirect costs of seed production within and between seasons in a gynodioecious species. *Oecologia*, 92, 266-272.

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. et Wilson, W.G. (2004) Pollen limitation of plant reproduction: Ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85, 2408-2421.

Baker, A.M., Barrett, S.C.H. et Thompson, J.D. (2000) Variation of pollen limitation in the early flowering Mediterranean geophyte *Narcissus assoanus* (Amaryllidaceae). *Oecologia*, 124, 529-535.

Barbero, M., Bonin, G., Loisel, R. et Quézel, P. (1990) Changes and disturbances of forest ecosystems caused by human activities in the western part of the Mediterranean Basin. *Vegetatio*, 87, 151-173.

Barkham, J.P. (1980) Population-dynamics of the Wild Daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*).1. Clonal growth, seed reproduction, mortality and the effects of density. *Journal of Ecology*, 68, 607-633.

Barkham, J.P. (1980) Population-dynamics of the Wild Daffodil (Narcissus pseudonarcissus).2. Changes in number of shoots and flowers, and the effect of bulb depth on growth and reproduction. *Journal of Ecology*, 68, 635-664.

Barkham, J.P. (1992). The effect of coppicing and neglect on the performance of the perennial ground flora. In *Ecology and management of coppiced woodlands* (eds B.G. P.), pp. 117-146. University Press, Cambridge.

Barkham, J.P. (1992) Population-dynamics of the Wild Daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*).4. Clumps and gaps. *Journal of Ecology*, 80, 797-808.

Barton, L.V. (1933) Seedling production of tree peony. *contributions from Boyce Thompson Institute*, 5, 451-460.

Baskin, C.C. et Baskin, J.M. (1998) *Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*, edn. Academic Press, London, U.K.

Baskin, J.M. et Baskin, C.C. (1984) Germination ecophysiology of the woodland herb *Osmorhiza longistylis* (Umbelliferae). *American Journal of Botany*, 71, 687-692.

Baskin, J.M. et Baskin, C.C. (1991) Nondeep complex morphophysiological dormancy in seeds of *Osmorhiza claytonii* (Apiaceae). *American Journal of Botany*, 78, 588-593.

Bastrenta, B., Lebreton, J.D. et Thompson, J.D. (1995) Predicting demographic-change in response to herbivory - a model of the effects of grazing and annual variation on the population-dynamics of *Anthyllis vulneraria*. *Journal of Ecology*, 83, 603-611.

Batlla, D., Kruk, B.C. et Benech-Arnold, R.L. (2000) Very early detection of canopy presence by seeds through perception of subtle modifications in red: far red signals. *Functional Ecology*, 14, 195-202.

Bell, G. et Koufopanou, V. (1986) The cost of reproduction. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 3, 83-131.

Benton, T.G. et Grant, A. (1996) How to keep fit in the real world: elasticity analyses and selection pressures on life histories in a variable environment. *American Naturalist*, 147, 115-139.

Bézanger-Beauquesne, L., Pinkas, M. et Trotin, F. (1980) *Plantes médicinales des régions tempérées.*, Maloine S.A. edn., Paris.

Bierzychudek, P. (1981) Pollinator limitation of plant reproductive effort. *American Naturalist*, 117, 838-840.

Boege, K. et Marquis, R.J. (2005) Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 441-448.

Bond, W.J. et Midgley, J.J. (2001) Ecology of sprouting in woody plants: the persistence niche. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 45-51.

Bruna, E.M. et Kress, W.J. (2002) Habitat fragmentation and the demographic structure of an Amazonian understory herb (*Heliconia acuminata*). *Conservation Biology*, 16, 1256-1266.

Bruna, E.M. et Oli, M.K. (2005) Demographic effects of habitat fragmentation on a tropical herb: Life-table response experiments. *Ecology*, 86, 1816-1824.

Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.*, Tec&Doc et Editions médicales internationales edn., Paris.

Brys, R., Jacquemyn, H., Endels, P., De Blust, G. et Hermy, M. (2004) The effects of grassland management on plant performance and demography in the perennial herb *Primula veris*. *Journal of Applied Ecology*, 41, 1080-1091.

Brys, R., Jacquemyn, H., Endels, P., Hermy, M. et De Blust, G. (2003) The relationship between reproductive success and demographic structure in remnant populations of *Primula veris*. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, 24, 247-253.

Buchheim, J.A.T., Burkhart, L.F. et Meyer, M.M. (1994) Effect of exogenous gibberellic-acid, abscisic-acid, and benzylaminopurine on epicotyl dormancy of cultured herbaceous peony embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36, 35-43.

Budelsky, R.A. et Galatowitsch, S.M. (1999) Effects of moisture, temperature, and time on seed germination of five wetland Carices: Implications for restoration. *Restoration Ecology*, 7, 86-97.

Buhler, C. et Schmid, B. (2001) The influence of management regime and altitude on the population structure of *Succisa pratensis*: implications for vegetation monitoring. *Journal of Applied Ecology*, 38, 689-698.

Bullock, J.M., Hill, B.C., Silvertown, J. et Sutton, M. (1995) Gap colonization as a source of grassland community change - Effects of gap size and grazing on the rate and mode of colonization by different species. *Oikos*, 72, 273-282.

Burd, M. (1995) Ovule packaging in stochastic pollination and fertilization environments. *Evolution*, 49, 100-109.

Bustamante, R.O., Simonetti, J.A. et Mella, J.E. (1992) Are foxes legitimate and efficient seed

dispersers - a field-test. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, 13, 203-208.
Butet, A. et Paillat, G. (1997) Insectivores et rongeurs de France: le Mulot Sylvestre - *Apodemus sylvaticus* (Linné, 1758). *Arvicola*, 9, 7-23.
Byers, D.L. et Meagher, T.R. (1992) Mate availability in small populations of plant-species with homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity*, 68, 353-359.
Cadenasso, M.L. et Pickett, S.T.A. (2001) Effect of edge structure on the flux of species into forest interiors. *Conservation Biology*, 15, 91-97.
Cadenasso, M.L., Traynor, M.M. et Pickett, S.T.A. (1997) Functional location of forest edges: gradients of multiple physical factors. *Canadian Journal Of Forest Research*, 27, 774-782.
Cain, M.L., Damman, H. et Muir, A. (1998) Seed dispersal and the Holocene migration of the woodland herbs. *Ecological Monographs*, 68, 325-347.
Cain, M.L., Milligan, B.G. et Strand, A.E. (2000) Long-distance dispersal in plant populations. *American Journal of Botany*, 87, 1217-1227.
Cariveau, D., Irwin, R.E., Brody, A.K., Garcia-Mayeya, L.S. et von der Ohe, A. (2004) Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. *Oikos*, 104, 15-26.
Castro, J., Gomez, J.M., Garcia, D., Zamora, R. et Hodar, J.A. (1999) Seed predation and dispersal in relict Scots pine forests in southern Spain. *Plant Ecology*, 145, 115-123.
Caswell, H. (2000) Prospective and retrospective perturbation analyses: Their roles in conservation biology. *Ecology*, 81, 619-627.
Caswell, H. (2001) *Matrix population models: construction, analysis, and interpretation*, 2nd edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland (USA).
Caughley, G. (1994) Directions in Conservation Biology. *Journal of Animal Ecology*, 63, 215-244.
Chapman, S.B., Rose, R.J. et Clarke, R.T. (1989) The behavior of populations of the Marsh Gentian (Gentiana pneumonanthe) - a modeling approach. *Journal of Applied Ecology*, 26, 1059-1072.
Charlesworth, D. (1989) Evolution of low female fertility in plants: pollen limitation, ressource allocation and genetic load. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 289-292.
Charnov, E.L. (1982) *The theory of sex allocation.*, edn. Princeton University Press, Princeton (New Jersey).
Charpentier, A., Grillas, P. et Thompson, J.D. (2000) The effects of population size limitation on fecundity in mosaic populations of the clonal macrophyte *Scirpus maritimus*. *American Journal of Botany*, 87, 502-507.
Charron, D. et Gagnon, D. (1991) The demography of northern populations of *Panax quinquefolium* (American Ginseng). *Journal of Ecology*, 79, 431-445.
Chen, J., Franklin, J.F. et Spies, T.A. (1995) Growing-season microclimatic gradients from clearcut edges into old-growth Douglas-Fir forests. *Ecological Applications*, 5, 74-86.
Cipollini, M.L., Wallacesenft, D.A. et Whigham, D.F. (1994) A model of patch dynamics, seed dispersal, and sex-ratio in the dioecious shrub *Lindera benzoin* (Lauraceae). *Journal of Ecology*, 82, 621-633.
Cipollini, M.L., Whigham, D.F. et J., O.N. (1993) Population growth, structure, and seed dispersal in the understory herb *Cynoglossum virginianum*: a population and patch dynamics model. *Plant Species Biology*, 8, 117-129.
Clarke, P.J. et Davison, E.A. (2004) Emergence and survival of herbaceous seedlings in temperate grassy woodlands: Recruitment limitations and regeneration niche. *Austral Ecology*, 29, 320-331.
Clauss, M.J. et Venable, D.L. (2000) Seed germination in desert annuals: An empirical test of adaptive bet hedging. *American Naturalist*, 155, 168-186.
Cohen, D. (1966) Optimizing reproduction in a randomly varying environment. *Journal of Theoretical Biology*, 12, 119-129.

Colas, B., Olivieri, I. et Riba, M. (1997) *Centaurea corymbosa*, a cliff-dwelling species tottering on the brink of extinction: a demographic and genetic study. In Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (eds, pp. 3471-3476.

Colas, B., Olivieri, I. et Riba, M. (2001) Spatio-temporal variation of reproductive success and conservation of the narrow-endemic *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). *Biological Conservation*, 99, 375-386.

Collins, B.S., Dunne, K.P. et Pickett, S.T.A. (1985). Responses of forest herbs to canopy gaps. In *The ecology of natural disturbance and patch dynamics* (eds S.T.A. Pickett et P.S. White), pp. Academic Press.

Crawley, M.J. (1983) *Herbivory: the dynamics of animal-plant interactions*, edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Daget, P. (1977) Mediterranean bioclimate - General characteristics and modes of definition. *Vegetatio*, 34, 1-20.

de Jong, T.J. et Klinkhamer, P.G.L. (1994) Plant size and reproductive success through female and male function. *Journal of Ecology*, 82, 399-402.

de Kroon, H., van Groenendael, J. et Ehrlen, J. (2000) Elasticities: A review of methods and model limitations. *Ecology*, 81, 607-618.

Debussche, M. et Isenmann, P. (1989) Fleshy fruit characters and the choices of bird and mammal seed dispersers in a mediterranean region. *Oikos*, 56, 327-338.

Debussche, M. et Isenmann, P. (1994) Bird-dispersed seed rain and seedling establishment in patchy mediterranean vegetation. *Oikos*, 69, 414-426.

Debussche, M., Lepart, J. et Molina, J. (1985) La dissémination des plantes à fruits charnus par les oiseaux: rôle de la structure de la végétation et impact sur la succession en région méditerranéenne. *Acta Oecologica*, 6, 65-80.

Debussche, M., Rambal, S. et Lepart, J. (1987) Les changements de l'occupation des terres en région Méditerranéenne humide: évaluation des conséquences hydrologiques. *Acta Oecologica*, 8, 317-332.

Dejong, T.J. et Klinkhamer, P.G.L. (1988) Seedling establishment of the biennials *Cirsium vulgare* and *Cynoglossum officinale* in a sand dune area - the importance of water for differential survival and growth. *Journal of Ecology*, 76, 393-402.

Delcros, P. (1994) *Landscape ecology and post-cultural plant dynamics in mountain areas*, edn.

di Pasquale, G., di Martino, P. et Mazzoleni, S. (2004). Forest history in the mediterranean region. In *Recent dynamics of the mediterranean vegetation and landscape* (eds S. Mazzoleni, G. di Pasquale, M. Mulligan, P. di Martino et F. Rego), pp. 281-285. Wiley, G. and Sons, Chichester.

Dietz, H. et Ullmann, I. (1997) Age-determination of dicotyledonous herbaceous perennials by means of annual rings: exception or rule? *Annals of Botany*, 80, 377-379.

Dudash, M.R. (1987) Relative fitness of selfed and outcrossed progeny in a self-compatible, protandrous species, *Sabatia angularis* L (Gentianaceae) - a comparison in three environments. *American Journal of Botany*, 74, 648-648.

Durand-Tullou, A. (1995) *Vissec et son étrange rivière*, edn. Espace Sud.

Ehrlen, J. (1996) Spatiotemporal variation in predispersal seed predation intensity. *Oecologia*, 108, 708-713.

Ehrlen, J. (2000) The dynamics of plant populations: Does the history of individuals matter? *Ecology*, 81, 1675-1684.

Ehrlen, J. (2002) Assessing the lifetime consequences of plant-animal interactions for the perennial herb *Lathyrus vernus* (Fabaceae). *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics*, 5, 145-163.

Ehrlén, J. (1992) Proximate limits to seed production in a herbaceous perennial legume, *Lathyrus vernus*. *Ecology*, 73, 1820-1831.

Ehrlen, J. et Lehtila, K. (2002) How perennial are perennial plants? *Oikos*, 98, 308-322.

Ehrlen, J., Syrjanen, K., Leimu, R., Garcia, M.B. et Lehtila, K. (2005) Land use and population growth of *Primula veris*: an experimental demographic approach. *Journal of Applied Ecology*, 42, 317-326.

Ehrlen, J. et Van Groenendael, J. (1998) Direct perturbation analysis for better conservation. *Conservation Biology*, 12, 470-474.

Ehrlen, J. et Van Groenendael, J. (2001) Storage and the delayed costs of reproduction in the understorey perennial *Lathyrus vernus*. *Journal of Ecology*, 89, 237-246.

Ehrlich, P.R. et Wilson, E.O. (1991) Biodiversity studies - Science and policy. *Science*, 253, 758-762.

El-Kassaby, Y.A. et Edwards, D.G.W. (2001) Germination ecology in mountain hemlock (*Tsuga mertensiana* (Bong.) Carr.). *Forest Ecology and Management*, 144, 183-188.

Elle, E. et Carney, R. (2003) Reproductive assurance varies with flower size in *Collinsia parviflora* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, 90, 888-896.

Ellstrand, N.C. et Elam, D.R. (1993) Population genetic consequences of small population-size - Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 217-242.

Enright, N.J., Franco, M. et Silvertown, J. (1995) Comparing plant life-histories using elasticity analysis - the importance of life-span and the number of life-cycle stages. *Oecologia*, 104, 79-84.

Eriksson, O. (1996) Regional dynamics of plants: a review of evidence for remnant, source-sink and metapopulation. *Oïkos*, 77, 248-258.

Escarre, J., Lepart, J., Sans, X., Sentuc, J.J. et Gorse, V. (1999) Effects of herbivory on the growth and reproduction of Picris hieracioides in the Mediterranean region. *Journal of Vegetation Science*, 10, 101-110.

Euskirchen, E.S., Chen, J. et Bi, R. (2001) Effect of edges on plant communities in a managed landscape in northern Wisconsin. *Forest Ecology and Management*, 148, 93-108.

Facelli, J.M., Williams, R., Fricker, S. et Ladd, B. (1999) Establishment and growth of seedlings of *Eucalyptus obliqua*: Interactive effects of litter, water, and pathogens. *Australian Journal of Ecology*, 24, 484-494.

Fenner, M. (1985) *Seed ecology*, edn. Chapman & Hall, London.

Fenner, M., Cresswall, J.E., Hurley, R.A. et Baldwin, T. (2002) Relationship between capitulum size and pre-dispersal seed predation by insect larvae in common Asteraceae. *Oecologia*, 130, 72-77.

Fenner, M., Hanley, M.E. et Lawrence, R. (1999) Comparison of seedling and adult palatability in annual and perennial plants. *Functional Ecology*, 13, 546-551.

Fieberg, J. et Ellner, S.P. (2001) Stochastic matrix models for conservation and management: a comparative review of methods. *Ecology Letters*, 4, 244-266.

Fischer, M. et Matthies, D. (1998) Experimental demography of the rare *Gentianella germanica*: seed bank formation and microsite effects on seedling establishment. *Ecography*, 21, 269-278.

Forget, P.M., Kitajima, K. et Foster, R.B. (1999) Pre- and post-dispersal seed predation in *Tachigali versicolor* (Caesalpiniaceae): effects of timing of fruiting and variation among trees. *Journal of Tropical Ecology*, 15, 61-81.

Foster, M.S. et Delay, L.S. (1998) Dispersal of mimetic seeds of three species of *Ormosia* (Leguminosae). *Journal of Tropical Ecology*, 14, 389-411.

Fournier, P. (1948) *Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France.*, Lechevalier edn., Paris.

Fowler, N.L. et Antonovics, J. (1981) Small-scale variability in the demography of transplants of 2 herbaceous species. *Ecology*, 62, 1450-1457.

Franco, M. et Silvertown, J. (2004) Comparative demography of plants based upon elasticities of vital rates. *Ecology*, 85, 531-538.

Frankham, R. (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126, 131-140.

Freville, H., Colas, B., Riba, M., Caswell, H., Mignot, A., Imbert, E. et Olivieri, I. (2004) Spatial and temporal demographic variability in the endemic plant species *Centaurea corymbosa*

(Asteraceae). *Ecology*, 85, 694-703.
Fréville, H., Justy, F. et Olivieri, I. (2001) Comparative allozyme and microsatellite population structure in a narrow endemic plant species, Centaurea corymbosa Pourret (Asteraceae). *Molecular Ecology*, 10, 879-889.
Fritz, R.S., Hochwender, C.G., Lewkiewicz, D.A., Bothwell, S. et Orians, C.M. (2001) Seedling herbivory by slugs in a willow hybrid system: developmental changes in damage, chemical defense, and plant performance. *Oecologia*, 129, 87-97.
Galetti, M. (2002). Seed dispersal of mimetic fruits: parasitism, mutualism, aposematism or exaptation? In *Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation* (eds D.J. Levey, W.R. Silva et M. Galetti), pp. CAB International, New York, US.
Gapare, W.J., Aitken, S.N. et Ritland, C.E. (2005) Genetic diversity of core and peripheral Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr) populations: implications for conservation of widespread species. *Biological Conservation*, 123, 113-123.
Garcia, D. et Zamora, R. (2003) Persistence, multiple demographic strategies and conservation in long-lived Mediterranean plants. *Journal of Vegetation Science*, 14, 921-926.
Garcia, D., Zamora, R., Hodar, J.A. et Gomez, J.M. (1999) Age structure of *Juniperus communis* L. In the Iberian peninsula: Conservation of remnant populations in Mediterranean mountains. *Biological Conservation*, 87, 215-220.
Garcia, M.B. (2003) Demographic viability of a relict population of the critically endangered plant *Borderea chouardii*. *Conservation Biology*, 17, 1672-1680.
Garcia, M.B. et Ehrlen, J. (2002) Reproductive effort and herbivory timing in a perennial herb: Fitness components at the individual and population levels. *American Journal of Botany*, 89, 1295-1302.
Garrido, B., Hampe, A., Maranon, T. et Arroyo, J. (2003) Regional differences in land use affect population performance of the threatened insectivorous plant Drosophyllum lusitanicum (Droseraceae). *Diversity and Distributions*, 9, 335-350.
Gaston, K.J. et Kunin, W.E. (1997). Rare-common differences: an overview. In *The biology of rarity* (eds W.E. Kunin et K.J. Gaston), pp. Chapman & Hall, London, U.K.
Gatsuk, L.E., Smirnova, O.V., Vorontzova, L.I., Zaugolnova, L.B. et Zhurkova, L.A. (1980) Age states of plants of various growth forms: a review. *Journal of Ecology*, 68, 675-696.
Génard, M. et Lescourret, F. (1985) Le Sanglier (*Sus scrofa scrofa* L.) et les diapores dans le Sud de la France. *Revue D Ecologie-La Terre Et La Vie*, 40, 343-353.
Gérard, J.F., Teillaud, P., Spitz, F., Mauget, R. et Campan, R. (1991) Le Sanglier. *Revue d'Ecologie - La Terre et la Vie*, suppl. 6, 11-66.
Gillespie, J.H. (1977) Natural-selection for variances in offspring numbers - New evolutionary principle. *American Naturalist*, 111, 1010-1014.
Gomez, J.M. et Zamora, R. (2000) Spatial variation in the selective scenarios of *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae). *American Naturalist*, 155, 657-668.
Goverde, M., Schweizer, K., Baur, B. et Erhardt, A. (2002) Small-scale fragmentation effects on pollinator behaviour: experimental evidence from the bumblebee *Bombus veteranus* on calcareous grasslands. *Biological Conservation*, 104, 293-299.
Griffin, S.R. et Barret, S.C.H. (2002) Factors affecting low seed:ovule ratios in a spring woodland herb, *Trillium grandiflorum* (Melantiaceae). *International Journal of Plant Science*, 163, 581-590.
Groom, M.J. (2001) Consequences of subpopulation isolation for pollination, herbivory, and population growth in *Clarkia concinna concinna* (Onagraceae). *Biological Conservation*, 100, 55-63.
Gross, K.L. (1981) Predictions of fate from rosette size in four 'biennial' plant species: *Verbascum thapsus, Oenothera biennis, Daucus carota*, and *Tragopogon dubius*. *Oecologia*, 48, 209-213.
Grubb, P.J. (1977) The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. *Biological revue*, 52, 107-145.

Guardia, R., Raventos, J. et Caswell, H. (2000) Spatial growth and population dynamics of a perennial tussock grass (Achnatherum calamagrostis) in a badland area. *Journal of Ecology*, 88, 950-963.

Guo, Q.F., Taper, M., Schoenberger, M. et Brandle, J. (2005) Spatial-temporal population dynamics across species range: from centre to margin. *Oikos*, 108, 47-57.

Haig, D. et Westoby, M. (1988) On limits to seed production. *American Naturalist*, 131, 757-759.

Halda, J.J. et Waddick, J.W. (2004) *The genus Paeonia*, edn. Timber Press Inc., Portland, U.S.

Hampe, A. et Arroyo, J. (2002) Recruitment and regeneration in populations of an endangered South Iberian Tertiary relict tree. *Biological Conservation*, 107, 263-271.

Hampe, A. et Petit, R.J. (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, 8, 461-467.

Hanley, M.E. et May, O.C. (2006) Cotyledon damage at the seedling stage affects growth and flowering potential in mature plants. *New Phytologist*, 169, 243-250.

Hanzawa, F.M. et Kalisz, S. (1993) The relationship between age, size, and reproduction in *Trillium grandiflorum* (Liliaceae). *American Journal of Botany*, 80, 405-410.

Hara, T. et Wakahara, M. (1994) Variation in individual growth and the population structure of a woodland perennial herb, *Paris tetraphylla*. *Journal of Ecology*, 82, 3-12.

Harms, K.E., Wright, S.J., Calderon, O., Hernandez, A. et Herre, E.A. (2000) Pervasive density-dependent recruitment enhances seedling diversity in a tropical forest. *Nature*, 404, 493-495.

Harper, J.L. (1977) *Population biology of plants.*, Academic press edn. Academic press, London.

Hedrick, P.W., Lacy, R.C., Allendorf, F.W. et Soulé, M.E. (1995) Directions in conservation biology: comments on Caughley. *Conservation Biology*, 10, 1312-1320.

Heenan, P.B. (1998) The pollination system and stigmatic cuticule of *Clianthus puniceus* (Fabaceae). *New Zealand Journal of Botany*, 36, 311-314.

Hegland, S.J., Van Leeuwen, M. et Oostermeijer, J.G.B. (2001) Population structure of *Salvia pratensis* in relation to vegetation and management of Dutch dry floodplain grasslands. *Journal of Applied Ecology*, 38, 1277-1289.

Heppell, S.S., Caswell, H. et Crowder, L.B. (2000) Life histories and elasticity patterns: Perturbation analysis for species with minimal demographic data. *Ecology*, 81, 654-665.

Herrera, C.M. (1982) Seasonal-variation in the quality of fruits and diffuse coevolution between plants and avian dispersers. *Ecology*, 63, 773-785.

Herrera, C.M. (1984) A study of avian frugivores, bird-dispersed plants, and their interaction in Mediterranean scrublands. *Ecological Monographs*, 54, 1-23.

Herrera, C.M. (1987) Vertebrate-dispersed plants of the Iberian Peninsula - a study of fruit characteristics. *Ecological Monographs*, 57, 305-331.

Herrera, C.M. (2000) Measuring the effects of pollinators and herbivores: Evidence for non-additivity in a perennial herb. *Ecology*, 81, 2170-2176.

Herrera, C.M. et Jordano, P. (1981) *Prunus mahaleb* and birds - the high-efficiency seed dispersal system of a temperate fruiting tree. *Ecological Monographs*, 51, 203-218.

Herrera, C.M., Medrano, M., Rey, P.J., Sanchez-Lafuente, A.M., Garcia, M.B., Guitian, J. et Manzaneda, A.J. (2002) Interaction of pollinators and herbivores on plant fitness suggests a pathway for correlated evolution of mutualism- and antagonism-related traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16823-16828.

Higgins, S.I., Nathan, R. et Cain, M.L. (2003) Are long-distance dispersal events in plants usually caused by nonstandard means of dispersal? *Ecology*, 84, 1945-1956.

Hodder, K.H. et Bullock, J.M. (1997) Translocations of native species in the UK: Implications for biodiversity. *Journal of Applied Ecology*, 34, 547-565.

Hollander, J.L. et Vander Wall, S.B. (2004) Effectiveness of six species of rodents as dispersers of singleleaf pinon pine (*Pinus monophylla*). *Oecologia*, 138, 57-65.

Hong, D.Y. (1997) *Paeonia* (Paeoniacea) in Xizang (Tibet). *Novon*, 7, 156-161.

Horvitz, C.C. et Schemske, D.W. (1994) Effects of dispersers, gaps, and predators on dormancy and seedling emergence in a tropical herb. *Ecology*, 75, 1949-1948.

Horvitz, C.C. et Schemske, D.W. (1995) Spatiotemporal variation in demographic transitions of a tropical understory herb: projection matrix analysis. *Ecological Monographs*, 65, 155-192.

Horvitz, C.C. et Schemske, D.W. (2002) Effects of plant size, leaf herbivory, local competition and fruit production on survival, growth and future reproduction of a neotropical herb. *Journal of Ecology*, 90, 279-290.

Hufford, K.M. et Mazer, S.J. (2003) Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 147-155.

Hulme, P.E. (1997) Post-dispersal seed predation and the establishment of vertebrate dispersed plants in Mediterranean scrublands. *Oecologia*, 111, 91-98.

Hulme, P.E. (1998) Post-dispersal seed predation: consequences for plant demography and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 1, 32-46.

Hulme, P.E. (2002). Seed-eaters: seed dispersal, destruction and demography. In *Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation* (eds D.J. Levey, W.R. Silva et M. Galetti), pp. CAB International, New York, US.

Hulme, P.E. et Benkman, C.W. (2002). Granivory. In *Plant-animal interactions: an evolutionary approach* (eds C.M. Herrera et O. Pellmyr), pp. Blackwell Science, Oxford, UK.

Hulme, P.E. et Kollmann, J. (2005). Seed predator guilds, spatial variation in post-dispersal seed predation and potential effects on plant demography: a temperate perspective. In *Seed fate: predation, dispersal and seedling establishment* (eds P.-M. Forget, J.E. Lambert, P.E. Hulme et S.B. Vander Wall), pp. CAB International, Wallingford, UK.

Husband, B.C. et Schemske, D.W. (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, 50, 54-70.

Isselstein, J., Tallowin, J.R.B. et Smith, R.E.N. (2002) Factors affecting seed germination and seedling establishment of Fen-meadow species. *Restoration Ecology*, 10, 173-184.

Izhaki, I., Walton, P.B. et Safriel, U.N. (1991) Seed shadows generated by frugivorous birds in an eastern mediterranean scrub. *Journal of Ecology*, 79, 575-590.

Jacquemyn, H., Brys, R. et Hermy, M. (2002) Patch occupancy, population size and reproductive success of a forest herb (*Primula elatior*) in a fragmented landscape. *Oecologia*, 130, 617-625.

Janzen, D.H. (1975) Intrahabitat and interhabitat variations in *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae) seed predation by *Amblycerus cistelinus* (Bruchidae) in Costa-Rica. *Ecology*, 56, 1009-1013.

Jensen, T.S. (1985) Seed-seed predator interactions of european beech, *Fagus silvatica* and forest rodents, *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*. *Oikos*, 44, 149-156.

Johnson, S.D., Collin, C.L., Wissman, H.J., Halvarsson, E. et Agren, J. (2004) Factors contributing to variation in seed production among remnant populations of the endangered daisy *Gerbera aurantiaca*. *Biotropica*, 36, 148-155.

Johnson, S.D., Peter, C.I., Nilsson, L.A. et Agren, J. (2003) Pollination success in a deceptive orchid is enhanced by co-occurring rewarding magnet plants. *Ecology*, 84, 2919-2927.

Johst, K., Brandl, R. et Eber, S. (2002) Metapopulation persistence in dynamic landscapes: the role of dispersal distance. *Oikos*, 98, 263-270.

Jongejans, E. et De Kroon, H. (2005) Space versus time variation in the population dynamics of three co-occurring perennial herbs. *Journal of Ecology*, 93, 681-692.

Jordano, P. (1995) Angiosperm fleshy fruits and seed dispersers: a comparative analysis of adaptation and constraints in plant-animal interactions. *American Naturalist*, 154, 163-191.

Jules, E.S. et Rathcke, B.J. (1999) Mechanisms of reduced Trillium recruitment along edges of old- growth forest fragments. *Conservation Biology*, 13, 784-793.

Jusaitis, M. (2005) Translocation trials confirm species factors affecting the establishment of three endangered plant species. *Ecological Management and Restoration*, 6, 61-67.

Jusaitis, M., Polomka, L. et Sorensen, B. (2004) Habitat specificity, seed germination and

experimental translocation of the endangered herb *Brachycome muelleri* (Asteraceae). *Biological Conservation*, 116, 251-266.

Kalisz, S., Hanzawa, F.M., Tonsor, S.J., Thiede, D.A. et Voigt, S. (1999) Ant-mediated seed dispersal alters pattern of relatedness in a population of *Trillium grandiflorum*. *Ecology*, 80, 2620-2634.

Kawecki, T.J. et Ebert, D. (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7, 1225-1241.

Kearns, C.A., Inouye, D.W. et Waser, N.M. (1998) Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 83-112.

Kearsley, M.J.C. et Whitham, T.G. (1989) Developmental-changes in resistance to herbivory - implications for individuals and populations. *Ecology*, 70, 422-434.

Keller, L.F. et Waller, D.M. (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 230-241.

Kelly, D. et Sork, V.L. (2002) Mast seeding in perennial plants: Why, how, where? *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 427-447.

Kelrick, M.I., Macmahon, J.A., Parmenter, R.R. et Sisson, D.V. (1986) Native seed preferences of shrub-steppe rodents, birds and ants - the relationships of seed attributes and seed use. *Oecologia*, 68, 327-337.

Kery, M., Matthies, D. et Spillmann, H.H. (2000) Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *Journal of Ecology*, 88, 17-30.

Kindvall, O. (2000) Comparative precision of three spatially realistic simulation models of metapopulation dynamics. *Ecological Bulletins*, 48, 101-110.

Kiviniemi, K. (2001) Evolution of recruitment features in plants: a comparative study of species in the Rosaceae. *Oikos*, 94, 250-262.

Klinkhamer, P.G.L., deJong, T.J. et Metz, H. (1997) Sex and size in cosexual plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 12, 260-265.

Klinkhamer, P.G.L. et Meelis, E. (1990) How to test for proportionality in the reproductive effort of plants. *The American Naturalist*, 135, 291-300.

Klinkhamer, P.G.L., Meelis, E., de Jong, T.J. et Weiner, J. (1992) On the analysis of size dependent reproductive output in plants. *Functional Ecology*, 6, 308-316.

Knight, T.M., Steets, J.A. et Ashman, T.L. (2006) A quantitative synthesis of pollen supplementation experiments highlights the contribution of resource reallocation to estimates of pollen limitation. *American Journal of Botany*, 93, 271-277.

Knight, T.M., Steets, J.A., Vamosi, J.C., Mazer, S.J., Burd, M., Campbell, D.R., Dudash, M.R., Johnston, M.O., Mitchell, R.J. et Ashman, T.L. (2005) Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36, 467-497.

Knox, J.S. (1997) A nine year demographic study of *Helenium virginicum* (Asteraceae), a narrow endemic seasonal wetland plant. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 124, 236-245.

Kollmann, J., Coomes, D.A. et White, S.M. (1998) Consistencies in post-dispersal seed predation of temperate fleshy-fruited species among seasons, years and sites. *Functional Ecology*, 12, 683-690.

Kon, H., Noda, T., Terazawa, K., Koyama, H. et Yasaka, M. (2005) Evolutionary advantages of mast seeding in *Fagus crenata*. *Journal of Ecology*, 93, 1148-1155.

Koricheva, J., Larsson, S. et Haukioja, E. (1998) Insect performance on experimentally stressed woody plants: A meta-analysis. *Annual Review of Entomology*, 43, 195-216.

Kremer, R.J. (1993) Management of weed seed banks with microorganisms. *Ecological Applications*, 3, 42-52.

Krenova, Z. et Leps, J. (1996) Regeneration of a *Gentiana pneumonanthe* population in an

oligotrophic wet meadow. *Journal of Vegetation Science*, 7, 107-112.
Kreyer, D., Oed, A., Walther-Hellwig, K. et 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.
Lande, R. (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241, 1455-1460.
Larsson, S. (1989) Stressful times for the plant stress - insect performance hypothesis. *Oikos*, 56, 277-283.
Lavergne, S., Debussche, M. et Thompson, J.D. (2005) Limitations on reproductive success in endemic *Aquilegia viscosa* (Ranunculaceae) relative to its widespread congener *Aquilegia vulgaris*: the interplay of herbivory and pollination. *Oecologia*, 142, 212-220.
Lavergne, S., Thompson, J.D., Garnier, E. et Debussche, M. (2004) The biology and ecology of endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *Oikos*, 107, 505-518.
Lavergne, S., Thuiller, W., Molina, J. et Debussche, M. (2005) Environmental and human factors influencing rare plant local occurrence, extinction and persistence: a 115 years study in the Mediterranean region. *Journal of Biogeography*, 32, 799-811.
Lawrence, W.S. (1993) Resource and pollen limitation: plant size-dependent reproductive patterns in *Physalis longifolia*. *American Naturalist*, 141, 296-313.
Lebreton, J.D. (2005) Age, stages, and the role of generation time in matrix models. *Ecological Modelling*, 188, 22-29.
Leimu, R., Syrjanen, K., Ehrlen, J. et Lehtila, K. (2002) Pre-dispersal seed predation in Primula veris: among-population variation in damage intensity and selection on flower number. *Oecologia*, 133, 510-516.
Lepart, J. et Debussche, M. (1992). Human impact on landscape patterning: Mediterranean examples. In *Landscape boundaries, consequences for biotic diversity and ecological flows* (eds J.A. Hansen et F. di Castri), pp. 76-106. Springer, New York.
Leung, A. et Foster, S. (1996) *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics.*, John Wiley and sons, INC edn. Wiley-Interscience, New York.
Levin, L., Caswell, H., Bridges, T., DiBacco, C., Cabrera, D. et Plaia, G. (1996) Demographic responses of estuarine polychaetes to pollutants: Life table response experiments. *Ecological Applications*, 6, 1295-1313.
Levin, S.A., Muller-Landau, H.C., Nathan, R. et Chave, J. (2003) The ecology and evolution of seed dispersal: A theoretical perspective. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 34, 575-604.
Lindborg, R. et Ehrlen, J. (2002) Evaluating the extinction risk of a perennial herb: Demographic data versus historical records. *Conservation Biology*, 16, 683-690.
Lloyd, D.G. et Bawa, K.S. (1984) Modification of the gender of seed plants in varying conditions. *Evolutionary Biology*, 17, 255-338.
Lloyd, D.G. et Schoen, D.J. (1992) Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences*, 153, 358-369.
Louda, S.M. et Potvin, M.A. (1995) Effect of Inflorescence-Feeding Insects on the Demography and Lifetime Fitness of a Native Plant. *Ecology*, 76, 229-245.
Luijten, S.H., Kery, M., Oostermeijer, J.G.B. et Den Nijs, H.C.M. (2002) Demographic consequences of inbreeding and outbreeding in *Arnica montana*: a field experiment. *Journal of Ecology*, 90, 593-603.
Mangel, M. et Tier, C. (1994) Four facts every conservation biologist should know about persistence. *Ecology*, 75, 607-614.
Maron, J.L. et Gardner, S.N. (2000) Consumer pressure, seed versus safe-site limitation, and plant population dynamics. *Oecologia*, 124, 260-269.
Matlack, G.R. (1993) Microenvironment variation within and among forest edge sites in the

eastern united states. *Biological Conservation*, 66, 185-194.
Maunder, M. (1992) Plant reintroduction - an overview. *Biodiversity and Conservation*, 1, 51-61.
Mazzoleni, S., di Pasquale, G. et Mulligan, M. (2004). Reversing the consensus on mediterranean desertification. In *Recent dynamics of the mediterranean vegetation and landscape* (eds S. Mazzoleni, G. di Pasquale, M. Mulligan, P. di Martino et F. Rego), pp. 281-285. Wiley, G. and Sons, Chichester.
McKay, J.K., Christian, C.E., Harrison, S. et Rice, K.J. (2005) "How local is local?" - A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology*, 13, 432-440.
Médail, F., Ziman, S., Boscaiu, M., Riera, J., Lambrou, M., Vela, E., Dutton, B. et Ehrendorfer, F. (2002) Comparative analysis of biological and ecological differentiation of *Anemone palmata* L. (Ranunculaceae) in the western Mediterranean (France and Spain): an assessment of rarity and population persistence. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 140, 95-114.
Méndez, M. et Obeso, J.R. (1993) Size-dependent reproductive and vegetative allocation in *Arum italicum* (Araceae). *Canadian Journal of Botany*, 71, 309-314.
Méndez, M. et Traveset, A. (2003) Sexual allocation in single-flowered hermaphroditic individuals in relation to plant and flower size. *Oecologia*, 137, 69-75.
Menges, E.S. (1990) Population viability analysis for an endangered plant. *Conservation Biology*, 4, 52-62.
Menges, E.S. (2000) Applications of population viability analyses in plant conservation. *Ecological Bulletins*, 48, 73-84.
Menges, E.S. (2000) Population viability analyses in plants: challenges and opportunities. *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 51-56.
Menges, E.S., Ascencio, P.F.Q., Weekley, C.W. et Gaoue, O.G. (2006) Population viability analysis and fire return intervals for an endemic Florida scrub mint. *Biological Conservation*, 127, 115-127.
Menges, E.S. et Dolan, R.W. (1998) Demographic viability of populations of *Silene regia* in midwestern prairies: relationships with fire management, genetic variation, geographic location, population size and isolation. *Journal of Ecology*, 86, 63-78.
Milton, S.J., Bond, W.J., Du Plessis, M.A., Gibbs, D., Hilton-Taylor, C., Linder, H.P., Raitt, L., Wood, J. et Donaldson, J.S. (1999) A protocol for plant conservation by translocation in threatened lowland Fynbos. *Conservation Biology*, 13, 735-743.
Molinier, R. et Müller, P. (1938) *La dissémination des espèces végétales*, edn. Imprimerie André Lesot, Paris.
Montalvo, A.M., Williams, S.L., Rice, K.J., Buchmann, S.L., Cory, C., Handel, S.N., Nabhan, G.P., Primack, R. et Robichaux, R.H. (1997) Restoration biology: A population biology perspective. *Restoration Ecology*, 5, 277-290.
Morgan, J.W. (1997) The effect of grassland gap size on establishment, growth and flowering of the endangered Rutidosis leptorrhynchoides (Asteraceae). *Journal of Applied Ecology*, 34, 566-576.
Morgan, M.T., Schoen, D.J. et Bataillon, T.M. (1997) The evolution of self-fertilization in perennials. *American Naturalist*, 150, 618-638.
Mothershead, K. et Marquis, R.J. (2000) Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology*, 81, 30-40.
Nathan, R. et Muller-Landau, H.C. (2000) Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 278-284.
Nathan, R., Perry, G., Cronin, J.T., Strand, A.E. et Cain, M.L. (2003) Methods for estimating long-distance dispersal. *Oikos*, 103, 261-273.
Navarro, L. et Guitian, J. (2003) Seed germination and seedling survival of two threatened endemic species of the northwest Iberian peninsula. *Biological Conservation*, 109, 313-320.

Ne'eman, G. (2003) To be or not to be - the effect of nature conservation management on flowering of *Paeonia mascula* (L.) Miller in Israel. *Biological Conservation*, 109, 103-109.

Neel, M.C. (2002) Conservation implications of the reproductive ecology of *Agalinis acuta* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, 89, 972-980.

Nicole, F., Brzosko, E. et Till-Bottraud, I. (2005) Population viability analysis of *Cypripedium calceolus* in a protected area: longevity, stability and persistence. *Journal of Ecology*, 93, 716-726.

Norris, K. (2004) Managing threatened species: the ecological toolbox, evolutionary theory and declining-population paradigm. *Journal of Applied Ecology*, 41, 413-426.

Obeso, J.R. (2002) The costs of reproduction in plants. *New Phytologist*, 155, 321-348.

Ohara, M., Takada, T. et Kawano, S. (2001) Demography and reproductive strategies of a polycarpic perennial, *Trillium apetalon* (Trilliaceae). *Plant Species Biology*, 16, 209-217.

Ohlson, M. (1988) Size-dependent reproductive effort in three populatins of *Saxifraga hirculis* in Sweden. *Journal of Ecology*, 76, 1007-1016.

Ollson, E.G.A., Austerheim, G. et Grenne, S.N. (2000) Landscape change patterns in mountains, land use and environmental diversity, Mid-Norway 1960-1993. *Landscape Ecology*, 15, 155-170.

Oostermeijer, J.G.B. (2000). Population viability analysis of the rare *Gentiana pneumonanthe*: the importance of genetics, demography and reproductive biology. In *Genetics, demography and viability of fragmented populations* (eds A.G. Young et P.J. Clarke), pp. 313-334. Cambridge University Press, Cambridge.

Oostermeijer, J.G.B., Brugman, M.L., De Boer, E.R. et Den Nijs, J.C.M. (1996) Temporal and spatial variation in the demography of *Gentiana pneumonanthe*, a rare perennial herb. *Journal of Ecology*, 83, 153-166.

Oostermeijer, J.G.B., Luijten, S.H. et den Nijs, J.C.M. (2003) Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation*, 113, 389-398.

Oostermeijer, J.G.B., Luijten, S.H., Krenova, Z.V. et Den Nijs, J.C.M. (1998) Relationships between population and habitat characteristics and reproduction of the rare *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology*, 12, 1042-1053.

Oostermeijer, J.G.B., Van't Veer, R. et Den Nijs, J.C.M. (1994) Population structure of the rare, long-lived perennial *Gentiana pneumonanthe* in relation to vegetation and management in the Netherlands. *Journal of Applied Ecology*, 31, 428-438.

Orsini, P. (1979). Recherches sur les rongeurs de quelques formations à Chênes du Midi de la France, Rep. No. Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier.

Ostergard, H. et Ehrlen, J. (2005) Among population variation in specialist and generalist seed predation - the importance of host plant distribution, alternative hosts and environmental variation. *Oikos*, 111, 39-46.

Ouborg, N.J. et Eriksson, O. (2004). Toward a metapopulation concept for plants. In *Ecology, genetics, and evolution of metapopulations* (eds I. Hanski et O.E. Gaggiotti), pp. 227-257. Eselvier Academic Press, London.

Parmenter, R.R., Macmahon, J.A. et Vanderwall, S.B. (1984) The measurement of granivory by desert rodents, birds and ants - a comparison of an energetics approach and a seed-dish technique. *Journal of Arid Environments*, 7, 75-92.

Pascarella, J.B. et Horvitz, C.C. (1998) Hurricane disturbance and the population dynamics of a tropical understory shrub: Megamatrix elasticity analysis. *Ecology*, 79, 547-563.

Peres, C.A. et van Roosmalen, M.G.M. (1996) Avian dispersal of "mimetic seeds" of *Ormosia lignivalvis* by terrestrial granivores: deception or mutualism? *Oikos*, 75, 249-258.

Petit, R.J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducousso, A. et Kremer, A. (1997) Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 9996-10001.

Pfister, C.A. (1998) Patterns of variance in stage-structured populations: Evolutionary predictions and ecological implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 213-218.

Pico, F.X., de Kroon, H. et Retana, J. (2002) An extended flowering and fruiting season has few demographic effects in a Mediterranean perennial herb. *Ecology*, 83, 1991-2004.

Pierson, E.A. et Turner, R.M. (1998) An 85-year study of saguaro (*Carnegiea gigantea*) demography. *Ecology*, 79, 2676-2693.

Pijl, L.v.d. (1972) *Principles of dispersal in higher plants*, second edn. Springer-Verlag, New York.

Pino, J., Sans, F.X. et Masalles, R.M. (2002) Size-dependent reproductive pattern and short-term reproductive cost in *Rumex obtusifolius* L. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, 23, 321-328.

Portnoy, S. et Willson, M.F. (1993) Seed dispersal curves: behavior of the tail of the distribution. *Evolutionary Ecology*, 7, 25-44.

Preiss, E., Martin, J.-L. et Debussche, M. (1997) Rural depopulation and recent changes in a Mediterranean region: consequences to the breeding avifauna. *Landscape Ecology*, 12, 51-61.

Prieur-Richard, A.H., Lavorel, S., Linhart, Y.B. et Dos Santos, A. (2002) Plant diversity, herbivory and resistance of a plant community to invasion in Mediterranean annual communities. *Oecologia*, 130, 96-104.

Primack, R.B. et Hall, P. (1990) Costs of reproduction in the Pink Ladys-Slipper Orchid - a 4-year experimental study. *American Naturalist*, 136, 638-656.

Primack, R.B. et Miao, S.L. (1992) Dispersal can limit local plant distribution. *Conservation Biology*, 6, 513-519.

Pulliam, H.R. (2000) On the relationship between niche and distribution. *Ecology Letters*, 3, 349-361.

Rabotnov, T.A. (1969) On coenopopulations of perennial herbaceous plants in natural coenoses. *Vegetatio*, 19, 87-97.

Reed, D.H. et Frankham, R. (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17, 230-237.

Reed, J.M., Mills, L.S., Dunning, J.B., Menges, E.S., McKelvey, K.S., Frye, R., Beissinger, S.R., Anstett, M.C. et Miller, P. (2002) Emerging issues in population viability analysis. *Conservation Biology*, 16, 7-19.

Retana, J., Pico, F.X. et Rodrigo, A. (2004) Dual role of harvesting ants as seed predators and dispersers of a non-myrmechorous Mediterranean perennial herb. *Oikos*, 105, 377-385.

Reznick, D. (1985) Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. *Oikos*, 44, 257-267.

Riba, M., Mignot, A., Freville, H., Colas, B., Imbert, E., Vile, D., Virevaire, M. et Olivieri, I. (2005) Variation in dispersal traits in a narrow-endemic plant species, *Centaurea corymbosa* pourret. (Asteraceae). *Evolutionary Ecology*, 19, 241-254.

Riba, M., Pico, F.X. et Mayol, M. (2002) Effects of regional climate and small-scale habitat quality on performance in the relict species *Ramonda myconi*. *Journal of Vegetation Science*, 13, 259-268.

Ridley, H.N. (1930) *The dispersal of plants throughout the world*, edn. Reeve L. and Co, Ashford, U.K.

Ries, L., Fletcher, R.J., Battin, J. et Sisk, T.D. (2004) Ecological responses to habitat edges: Mechanisms, models, and variability explained. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 35, 491-522.

Ries, L. et Sisk, T.D. (2004) A predictive model of edge effects. *Ecology*, 85, 2917-2926.

Root, R.B. (1973) Organization of a plant-arthropod association in simple and diverse habitats - fauna of Collards (Brassica-Oleracea). *Ecological Monographs*, 43, 95-120.

Rousset, O. et Lepart, J. (1999) Evaluer l'impact du pâturage sur le maintien des milieux ouverts. Le cas des pelouses sèches. *Fourrages*, 159, 223-235.

Russell, S.K. et Schupp, E.W. (1998) Effects of microhabitat patchiness on patterns of seed

dispersal and seed predation of *Cercocarpus ledifolius* (Rosaceae). *Oïkos*, 81, 434-443.
Saether, B.E. et Bakke, O. (2000) Avian life history variation and contribution of demographic traits to the population growth rate. *Ecology*, 81, 642-653.
Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M. et Wall, D.H. (2000) Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287, 1770-1774.
Samson, D.A. et Werk, K.S. (1986) Size-dependent effects in the analysis of reproductive effort in plants. *American Naturalist*, 127, 667-680.
Sanchez-Lafuente, A.M. (2002) Floral variation in the generalist perennial herb *Paeonia broteroi* (Paeoniaceae): Differences between regions with different pollinators and herbivores. *American Journal of Botany*, 89, 1260-1269.
Sanchez-Lafuente, A.M., Rey, P.J., Alcantara, J.M. et Valera, F. (1999) Breeding system and the role of floral visitors in seed production of a "few-flowered" perennial herb, *Paeonia broteroi* Boiss.& Reut. (Paeoniaceae). *Ecoscience*, 6, 163-172.
Sang, T., Crawford, D.J. et Stuessy, T.F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniceae). *American Journal of Botany*, 84, 1120-1136.
Schaefer, H.M., Schaefer, V. et Levey, D.J. (2004) How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 577-584.
Schemske, D.W., Husband, B.C., Ruckelshaus, M.H., Goodwillie, C., Parker, I.M. et Bishop, J.G. (1994) Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology*, 75, 584-606.
Schlising, R.A. (1976) Reproductive proficiency in *Paeonia californica* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 63, 1095-1103.
Schmitt, E. (1998) Les Pivoines. *Plantes de Montagne*, 186, 372-382.
Sigrist, M.R. et M., S. (2004) Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical *Malpighiaceae*: stigma morphology and itd implication for the breeding system. *Annals of Botany*, 94, 33-41.
Silvertown, J., Franco, M. et Menges, E. (1996) Interpretation of elasticity matrices as an aid to the management of plant populations for conservation. *Conservation Biology*, 10, 591-597.
Silvertown, J., Franco, M., Pisanty, I. et Mendoza, A. (1993) Comparative plant demography-relative importance of life-cycle components to the finite rate of increase in woody and herbaceous perennials. *Journal of Ecology*, 81, 465-476.
Snow, B. et Snow, D. (1988) *Birds and berries, a study of an ecological interaction*, edn. T. & A.D. Poyser, Calton, U.K.
Soulé, M.E. (1985) What Is Conservation Biology. *Bioscience*, 35, 727-734.
Sperens, U. (1997) Fruit production in *Sorbus aucuparia* L (Rosaceae) and pre-dispersal seed predation by the apple fruit moth (*Argyresthia conjugella* Zell). *Oecologia*, 110, 368-373.
Steffan-Dewenter, I. et Tscharntke, T. (1999) Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set. *Oecologia*, 121, 432-440.
Stephenson, A.G. (1981) Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 12, 253-279.
Stocklin, J. et Fischer, M. (1999) Plants with longer-lived seeds have lower local extinction rates in grassland remnants 1950-1985. *Oecologia*, 120, 539-543.
Storfer, A. (1999) Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biological Conservation*, 87, 173-180.
Stuefer, J.F. et 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.
Summerfield, R. (1972) Biological inertia - example. *Journal of Ecology*, 60, 793-&.

Sutherland, S. et Delph, L.F. (1984) On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit set. *Ecology*, 65, 1093-1104.

Svensson, B.M., Carlsson, B.A., Karlsson, P.S. et Nordell, K.O. (1993) Comparative long-term demography of three species of *Pinguicula*. *Journal of Ecology*, 81, 635-645.

Szentesi, A. et Jermy, T. (2003) Pre-dispersal seed predation and seed limitation in an annual legume. *Basic and Applied Ecology*, 4, 207-218.

Tatoni, T., Medail, F., Roche, P. et Barbero, M. (2004). The impact of changes in land use on ecological patterns in Provence (mediterranean France). In *Recent dynamics of the mediterranean vegetation and landscape* (eds S. Mazzoleni, G. di Pasquale, M. Mulligan, P. di Martino et F. Rego), pp. 107-120. Wiley, G. and Sons, Chichester.

Thompson, J.D. (2005) *Plant evolution in the Mediterranean*, edn. Oxford University Press, Oxford, U.K.

Thompson, J.D. et Dommée, B. (2000) Morph specific stigma height variation in distylous *Jasminum fruticans*. *New Phytologist*, 148, 303-314.

Ticktin, T. et Nantel, P. (2004) Dynamics of harvested populations of the tropical understory herb *Aechmea magdalenae* in old-growth versus secondary forests. *Biological Conservation*, 120, 461-470.

Tomimatsu, H. et Ohara, M. (2002) Effects of forest fragmentation on seed production of the understory herb *Trillium camschatcense*. *Conservation Biology*, 16, 1277-1285.

Tomimatsu, H. et Ohara, M. (2004) Edge effects on recruitment of *Trillium camschatcense* in small forest fragments. *Biological Conservation*, 117, 509-519.

Totland, O. et Eide, W. (1999) Environmentally-dependent pollen limitation on seed production in alpine *Ranunculus acris*. *Ecoscience*, 6, 173-179.

Traveset, A. (1995) Spatiotemporal variation in pre-dispersal reproductive losses of a mediterranean shrub, *Euphorbia dendroides* L. *Oecologia*, 103, 118-126.

Travis, J. (1992). Components of reproductive success in the herbaceous perennial *Amianthum muscaetoxicum*. In *Ecology and Evolution of Plant Reproduction* (eds R. Wyatt), pp. 255-280. Chapman and Hall, New York.

Valverde, T. et Silvertown, J. (1995) Spatial variation in the seed ecology of a woodland herb (*Primula vulgaris*) in relation to light environment. *Functional Ecology*, 9, 942-950.

Valverde, T. et Silvertown, J. (1997) An integrated model of demography, patch dynamics and seed dispersal in a woodland herb, *Primula vulgaris*. *Oïkos*, 80, 67-77.

Valverde, T. et Silvertown, J. (1998) Variation in the demography of a woodland understorey herb (Primula vulgaris) along the forest regeneration cycle: projection matrix analysis. *Journal of Ecology*, 86, 545-562.

Van der Voort, M.E., Bailey, B., Samuel, D.E. et McGraw, J.B. (2003) Recovery of populations of goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) and American ginseng (*Panax quinquefolius* l.) following harvest. *American Midland Naturalist*, 149, 282-292.

Vellend, M., Myers, J.A., Gardescu, S. et Marks, P.L. (2003) Dispersal of Trillium seeds by deer: Implications for long-distance migration of forest herbs. *Ecology*, 84, 1067-1072.

Venable, D.L. et Brown, J.S. (1988) The selective interactions of dispersal, dormancy, and seed size as adaptations for reducing risk in variable environments. *American Naturalist*, 131, 360-384.

Vergeer, P., Rengelink, R., Copal, A. et Ouborg, N.J. (2003) The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of Succisa pratensis. *Journal of Ecology*, 91, 18-26.

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J. et Mellilo, J.M. (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277, 494-499.

Vucetich, J.A. et Waite, T.A. (2003) Spatial patterns of demography and genetics processes across the species' range: null hypotheses for landscape conservation genetics. *Conservation Genetics*,

4, 639-645.

Walck, J.L., Baskin, J.M. et Baskin, C.C. (1999) Role of succession, light, nutrients and disturbance on population vigor and maintenance of the rare plant *Solidago shortii* (Asteraceae). *Plant ecology*, 145, 133-147.

Wang, B.C. et Smith, T.B. (2002) Closing the seed dispersal loop. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 379-385.

Wang, H. et van Staden, J. (2002) Seedling establishment characteristics of *Paeonia ostii* var. lishizhenii. *South African Journal of Botany*, 68, 386-388.

Warner, P.J. et Cushman, J.H. (2002) Influence of herbivores on a perennial plant: variation with life history stage and herbivore species. *Oecologia*, 132, 77-85.

Waser, N.M., Price, P.W. et Shaw, R.G. (2000) Outbreeding depression varies among cohorts of *Ipomopsis aggregata* planted in nature. *Evolution*, 54, 485-491.

Weiblen, G.D. et Thomson, J.D. (1995) Seed dispersal in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae). *Oecologia*, 102, 211-219.

Whale, D.M. (1984) Habitat Requirements in *Primula* Species. *New Phytologist*, 97, 665-679.

White, T.C.R. (1984) The abundance of invertebrate herbivores in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia*, 63, 90-105.

Wiens, D. (1984) Ovule survivorship, brood size, life history, breeding systems, and reproductive success in plants. *Oecologia*, 64, 47-53.

Willi, Y., Van Buskirk, J. et Fischer, M. (2005) A threefold genetic allee effect: Population size affects cross-compatibility, inbreeding depression and drift load in the self-incompatible Ranunculus reptans. *Genetics*, 169, 2255-2265.

Willson, M.F. et Traveset, A. (2000). The ecology of seed dispersal. In *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities* (eds M. Fenner), pp. CAB International, Wallingford, UK.

Wolff, A. et Debussche, M. (1999) Ants as dispersers in a Mediterranean old-field succession. *Oikos*, 84, 443-452.

Worley, A.C., Baker, A.M., Thompson, J.D. et Barrett, S.C.H. (2000) Floral display in Narcissus: variation in flower size and number at the species, population, and individual levels. *International Journal of Plant Science*, 161, 69-79.

Worley, A.C. et Harder, L.D. (1996) Size-dependent resource allocation and costs of reproduction in *Pinguicula vulgaris* (Lentibulariaceae). *Journal of Ecology*, 84, 195-206.

Wright, S.I. et Barrett, S.C.H. (1999) Size-dependent gender modification in a hermaphroditic perennial herb. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 266, 225-232.

Young, A.G., brown, A.H.D., Murray, B.G., Thrall, P.H. et Miller, C.H. (2000). Genetic erosion, restricted mating and reduced viability in fragmented populations of the endangered grassland herb *Rutidosis leptorrhynchoides*. In *Genetics, demography and viability of fragmented populations* (eds A.G. Young et P.J. Clarke), pp. 335-359. Cambridge University Press, Cambridge.

Zimmerman, M. et Pyke, G.H. (1988) Reproduction in *Polemonium*: assessing the factors limiting seed set. *American Naturalist*, 131, 723-738.

Annexe 1

Détail des données de démographie

		PSL		TAU		STF		VIS	
		Ouvert	Fermé	Ouvert	Fermé	Ouvert	Fermé	Ouvert	Fermé
Nombre de tiges	P	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0 ± 0.0	1.0	1.0
	V1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0	1.0 ± 0.0
	V2	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1
	A	1.1 ± 0.1	1.0	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.3	2.4 ± 1.0	1.2 ± 0.1	1.0	1.6 ± 0.3
	R	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.7	3.3 ± 0.3	1.9 ± 0.3	3.0 ± 0.5	1.3 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1
Hauteur (cm)	P	5.1 ± 0.2	6.9 ± 0.5	5.5 ± 1.0	5.3 ± 0.9	4.7 ± 0.2	6.3 ± 0.6	4.8 ± 0.1	5.9 ± 0.2
	V1	10.5 ± 0.6	13.6 ± 0.5	7.4 ± 0.8	8.0 ± 0.6	7.1 ± 0.5	11.9 ± 0.6	8.0 ± 0.4	9.4 ± 0.4
	V2	20.4 ± 0.7	18.7 ± 0.7	19.6 ± 2.5	19.0 ± 0.6	18.9 ± 1.0	21.1 ± 0.7	18.9 ± 0.9	19.3 ± 0.7
	A	26.2 ± 1.2	29.5 ± 3.3	25.5 ± 5.2	21.5 ± 1.9	24.7 ± 2.4	24.7 ± 1.4	23.3 ± 2.8	24.5 ± 1.8
	R	34.3 ± 0.8	34.7 ± 1.9	48.6 ± 1.6	39.7 ± 1.9	42.4 ± 1.6	43.9 ± 2.7	46.2 ± 1.8	43.2 ± 1.6
Nombre de feuilles	P	1.0	1.0	1.0	2.0 ± 0.7	1.0	1.1 ± 0.1	1.0	1.0
	V1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.0	1.1 ± 0.0
	V2	3.2 ± 0.2	2.5 ± 0.1	4.0 ± 0.4	4.6 ± 0.4	4.1	3.0 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2
	A	4.7 ± 0.2	3.5 ± 0.3	5.8 ± 1.3	5.8 ± 1.0	7.3 ± 2.1	4.5 ± 0.3	4.8 ± 0.2	5.7 ± 0.8
	R	6.1 ± 0.3	7.7 ± 2.2	19.6 ± 2.1	8.8 ± 1.4	11.6 ± 1.3	5.0 ± 0.4	9.9 ± 1.0	6.5 ± 0.4
Surface foliaire (cm^2)	P	26.9 ± 1.4	44.0 ± 6.7	34.3 ± 7.8	36.0 ± 6.7	24.7 ± 1.3	29.5 ± 2.8	22.2 ± 1.3	25.1 ± 1.5
	V1	142.5 ± 14.2	242.2 ± 17.6	88.1 ± 19.3	167.0 ± 32.2	69.3 ± 9.3	217.6 ± 21.3	82.1 ± 9.9	136.1 ± 13.3
	V2	1160.4 ± 80.4	984.9 ± 75.2	1555.8 ± 360.4	2259.2 ± 235.5	1182.4 ± 200.9	1632.6 ± 95.2	1220.9 ± 135.2	1416.9 ± 139.0
	A	2253.4 ± 177.8	2262.8 ± 196.1	3583.9 ± 1291.5	3155.0 ± 808.7	2321.8 ± 565.6	2772.0 ± 341.0	2717.4 ± 524.7	3331.5 ± 503.5
	R	2608.1 ± 149.6	3788.1 ± 960.5	13939.3 ±1799.6	5220.4 ± 1159.4	4679.8 ± 517.7	2755.8 ± 245.0	5713.5 ± 805.5	4055.8 ± 388.9
Effectif	P	105	22	5	8	100	51	154	124
	V1	56	60	9	32	66	76	76	101
	V2	74	61	11	73	33	68	29	84
	A	23	4	4	6	10	22	5	13
	R	27	3	48	13	38	12	28	26

Matrices de transition 2003-2005 pour chaque milieu dans chaque site (matrice moyenne 2003-2005). En colonne, stade au temps t, en ligne stade au temps t+1.

		Milieu ouvert						Milieu fermé					
		GR	**P**	**V1**	**V2**	**A**	**R**	**GR**	**P**	**V1**	**V2**	**A**	**R**
PSL	**GR**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.2446	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	P	0.3969	0.2183	0.0451	0.0000	0.0000	0.5346	0.0000	0.3103	0.0161	0.0000	0.0000	0.0581
	V1	0.1588	0.2324	0.6617	0.0692	0.0000	0.0594	0.0000	0.2759	0.7903	0.1570	0.0000	0.0000
	V2	0.0000	0.0000	0.1128	0.7799	0.2963	0.3514	0.0000	0.0000	0.0968	0.7934	0.4286	0.0000
	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.1006	0.4630	0.3514	0.0000	0.0000	0.0000	0.0248	0.4286	0.5000
	R	0.0000	0.0000	0.0000	0.0126	0.2407	0.2703	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1429	0.5000
STF	**GR**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	5.8156	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.2402
	P	0.5103	0.2519	0.0800	0.0000	0.0000	0.4748	0.2023	0.4615	0.0704	0.0000	0.0000	0.0358
	V1	0.0919	0.2977	0.6700	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2692	0.6972	0.0350	0.0250	0.0000
	V2	0.0000	0.0000	0.0500	0.7600	0.3200	0.1250	0.0000	0.0000	0.1127	0.8392	0.2750	0.5000
	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0600	0.4800	0.2857	0.0000	0.0000	0.0000	0.0979	0.4000	0.3462
	R	0.0000	0.0000	0.0000	0.0200	0.2000	0.5714	0.0000	0.0000	0.0000	0.0140	0.2750	0.1538
VIS	**GR**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	8.3970	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	4.6089
	P	0.3356	0.2909	0.0519	0.0000	0.0000	0.0909	0.3816	0.3316	0.0190	0.0064	0.0000	0.4628
	V1	0.1949	0.3394	0.7037	0.0227	0.0000	0.0000	0.2410	0.2158	0.6825	0.0641	0.0000	0.0000
	V2	0.0000	0.0000	0.0593	0.7273	0.2222	0.0816	0.0000	0.0053	0.0900	0.7115	0.2059	0.1667
	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909	0.3333	0.0408	0.0000	0.0000	0.0142	0.1218	0.3235	0.2708
	R	0.0000	0.0000	0.0000	0.1136	0.4444	0.8571	0.0000	0.0000	0.0000	0.0641	0.4118	0.5625
TAU	**GR**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	8.2137	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4768
	P	0.1658	0.1000	0.0476	0.0000	0.0000	3.9154	0.1266	0.4375	0.0000	0.0000	0.0000	0.1570
	V1	0.2902	0.2000	0.5714	0.0000	0.0000	1.5321	0.1773	0.1250	0.6393	0.0547	0.0000	0.0121
	V2	0.0000	0.1000	0.0952	0.4444	0.1667	0.0097	0.0000	0.0000	0.0656	0.7500	0.7143	0.2083
	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.2222	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.1905	0.2500
	R	0.0000	0.0000	0.0476	0.2222	0.6667	0.9709	0.0000	0.0000	0.0000	0.0078	0.0952	0.5417

Valeurs des paramètres démographiques pour chaque milieu dans chaque site (matrice moyenne 2003-2005).

	PSL		STF		VIS		TAU	
	Ouvert	**Fermé**	**Ouvert**	**Fermé**	**Ouvert**	**Fermé**	**Ouvert**	**Fermé**
s0	0.556	0.023	0.602	0.202	0.531	0.623	0.456	0.304
s2	0.451	0.586	0.55	0.731	0.63	0.553	0.4	0.563
s3	0.82	0.903	0.8	0.88	0.815	0.806	0.762	0.705
s4	0.962	0.975	0.94	0.986	0.955	0.968	0.889	0.938
s5	1	1	1	0.975	1	0.941	1	1
s6	0.973	1	0.982	1	0.98	1	0.981	1
f16	4.039	0	9.657	6.13	15.828	7.403	18.013	1.569
f26	0.962	2.498	0.788	0.177	0.171	0.743	8.586	0.517
f36	0.107	0	0	0	0	0	3.36	0.04
d23	0.055	0.018	0.1	0.08	0.064	0.024	0.062	0
d24	0	0	0	0	0	0.007	0	0
d34	0.072	0.161	0.106	0.035	0.024	0.066	0	0.058
d45	0.296	0.429	0.32	0.282	0.222	0.219	0.167	0.714
d56	0.361	0.5	0.291	0.346	0.042	0.271	0	0.25
d46	0.361	0	0.127	0.5	0.083	0.167	0.01	0.208
c21	0.714	0	0.847	1	0.633	0.613	0.364	0.417
c31	0.286	0	0.153	0	0.367	0.387	0.636	0.583
c32	0.516	0.471	0.542	0.368	0.538	0.39	0.5	0.222
c42	0	0	0	0	0	0.01	0.25	0
c53	0	0	0	0	0	0.018	0	0
c63	0	0	0	0	0	0	0.062	0
c43	0.138	0.107	0.063	0.128	0.073	0.112	0.125	0.093
c54	0.105	0.025	0.064	0.099	0.095	0.126	0.25	0.133
c64	0.013	0	0.021	0.014	0.119	0.066	0.25	0.008
c65	0.241	0.143	0.2	0.282	0.444	0.438	0.667	0.095

Elasticités de λ aux paramètres de transition pour chaque milieu dans chaque site (matrice moyenne 2003-2005).

		Milieu ouvert						Milieu fermé					
		GR	**P**	**V1**	**V2**	**A**	**R**	**GR**	**P**	**V1**	**V2**	**A**	**R**
PSL	**GR**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0159	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	P	0.0070	0.0037	0.0017	0.0000	0.0000	0.0040	0.0000	0.0017	0.0031	0.0000	0.0000	0.0002
	V1	0.0090	0.0127	0.0820	0.0148	0.0000	0.0014	0.0000	0.0034	0.3499	0.0608	0.0000	0.0000
	V2	0.0000	0.0000	0.0362	0.4319	0.0457	0.0222	0.0000	0.0000	0.0610	0.4370	0.0171	0.0000
	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0776	0.0995	0.0309	0.0000	0.0000	0.0000	0.0173	0.0217	0.0083
	R	0.0000	0.0000	0.0000	0.0118	0.0628	0.0289	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0085	0.0098
STF	**GR**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0283	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0041
	P	0.0199	0.0102	0.0055	0.0000	0.0000	0.003	0.0041	0.0067	0.0028	0.0000	0.0000	0.0006
	V1	0.0084	0.0284	0.1079	0.0085	0.0000	0.0000	0.0000	0.0075	0.0522	0.0114	0.0019	0.0000
	V2	0.0000	0.0000	0.0398	0.3200	0.0315	0.0092	0.0000	0.0000	0.0180	0.5830	0.0433	0.0323
	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0479	0.0896	0.0401	0.0000	0.0000	0.0000	0.0711	0.0659	0.0234
	R	0.0000	0.0000	0.0000	0.0242	0.0565	0.1212	0.0000	0.0000	0.0000	0.0111	0.0493	0.0113
VIS	**GR**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0643	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0560
	P	0.0268	0.0112	0.0037	0.0000	0.0000	0.0010	0.0189	0.0116	0.0011	0.0002	0.0000	0.0053
	V1	0.0375	0.0314	0.1208	0.0008	0.0000	0.0000	0.0371	0.0234	0.1193	0.0052	0.0000	0.0000
	V2	0.0000	0.0000	0.0660	0.1661	0.0079	0.0135	0.0000	0.0019	0.0522	0.1927	0.0204	0.0196
	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0313	0.0178	0.0101	0.0000	0.0000	0.0125	0.0502	0.0489	0.0483
	R	0.0000	0.0000	0.0000	0.0553	0.0335	0.3012	0.0000	0.0000	0.0000	0.0385	0.0906	0.1463
TAU	**GR**	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0632	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0014
	P	0.0122	0.0049	0.0028	0.0000	0.0000	0.0512	0.0002	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0005
	V1	0.0510	0.0232	0.0787	0.0000	0.0000	0.0477	0.0012	0.0007	0.0276	0.0100	0.0000	0.0002
	V2	0.0000	0.0429	0.0485	0.0418	0.0027	0.0011	0.0000	0.0000	0.0121	0.5884	0.1095	0.0114
	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0342	0.0044	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1143	0.0340	0.0160
	R	0.0000	0.0000	0.0707	0.0610	0.0315	0.3262	0.0000	0.0000	0.0000	0.0087	0.0208	0.0422

Valeurs des elasticités de λ aux paramètres démographiques pour chaque milieu dans chaque site (matrice moyenne 2003-2005), et somme des élasticités aux fécondités (F), croissances (C) et décroissances (D).

	PSL		STF		VIS		TAU	
	Ouvert	**Fermé**	**Ouvert**	**Fermé**	**Ouvert**	**Fermé**	**Ouvert**	**Fermé**
f16	0.0159	0	0.0283	0.0042	0.0643	0.056	0.0632	0.0014
f26	0.004	0.0002	0.003	0.0006	0.001	0.0053	0.0512	0.0005
f36	0.0014	0	0	0	0	0	0.0477	0.0002
s0	0.0374	0.0002	0.0596	0.0089	0.1295	0.1172	0.2253	0.0035
s2	0.0164	0.0051	0.0386	0.0136	0.0426	0.0369	0.0711	0.0014
s3	0.12	0.4141	0.1531	0.0643	0.1905	0.185	0.2006	0.0398
s4	0.5361	0.5152	0.4006	0.6721	0.2534	0.2868	0.137	0.7214
s5	0.208	0.0474	0.1776	0.1714	0.0592	0.1599	0.0386	0.1643
s6	0.0821	0.0181	0.1706	0.0697	0.3248	0.2142	0.3273	0.0696
d24	-0.0039	-0.004	-0.0074	-0.0022	-0.0052	-0.0023	-0.0038	0
d34	0	0	0	0	0	-0.0016	0	0
d45	-0.0235	-0.0257	-0.0336	-0.0129	-0.0044	-0.0121	0	-0.0329
d56	-0.018	-0.0046	-0.0282	-0.0032	-0.004	-0.0107	-0.0017	-0.0181
d46	-0.0154	0	-0.0173	-0.0048	-0.0152	-0.0238	-0.0021	-0.0048
d24	-0.0066	-0.0015	-0.0205	-0.0017	-0.0042	-0.0221	0	-0.0035
c21	0.007	0	0.0199	0.0042	0.0268	0.0189	0.0122	0.0002
c31	0.009	0	0.0084	0	0.0375	0.0371	0.051	0.0012
c42	0	0	0	0	0	0.0017	0.0381	0
c53	0.0222	0.0181	0.0318	0.0085	0.0558	0.0364	0.0353	0.0093
c63	0	0	0	0	0	0.01	0	0
c43	0	0	0	0	0	0	0.0642	0
c54	0.0219	0.0037	0.0226	0.0047	0.0105	0.0172	0.0133	0.0162
c64	0.0048	0	0.0157	0.0014	0.0293	0.0211	0.0401	0.0026
c65	0.0111	0.0013	0.0191	0.0034	0.0098	0.0284	0.0138	0.0038
C	0.076	0.0231	0.1175	0.0222	0.1698	0.1709	0.268	0.0332
D	-0.0673	-0.0358	-0.107	-0.0248	-0.033	-0.0725	-0.0077	-0.0593
F	0.0214	0.0002	0.0313	0.0047	0.0652	0.0612	0.1621	0.0021

Matrices N (temps passé dans chaque transition) à partir de la matrice moyenne (2003-2005) pour chaque milieu dans chaque site.

		Milieu ouvert						Milieu fermé					
		GR	**P**	**V1**	**V2**	**A**	**R**	**GR**	**P**	**V1**	**V2**	**A**	**R**
PSL	**GR**	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	P	0.57	1.35	0.23	0.14	0.14	0.14	0.00	1.53	0.20	0.17	0.17	0.17
	V1	1.09	1.17	3.94	2.49	2.44	2.37	0.00	3.34	8.36	7.22	7.22	7.22
	V2	1.12	1.21	4.06	11.68	11.44	11.13	0.00	1.78	4.45	9.34	9.35	9.35
	A	0.28	0.31	1.03	2.96	5.27	3.96	0.00	0.10	0.26	0.54	2.87	2.87
	R	0.11	0.12	0.41	1.18	1.94	2.87	0.00	0.03	0.07	0.15	0.82	2.82
STF	**GR**	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	P	0.80	1.50	0.40	0.25	0.24	0.23	0.44	2.20	0.68	0.46	0.45	0.46
	V1	1.10	1.49	3.74	2.30	2.25	2.17	0.53	2.61	5.23	3.54	3.45	3.50
	V2	0.34	0.46	1.15	6.87	6.72	6.48	1.00	4.95	9.90	23.50	21.60	22.72
	A	0.06	0.09	0.22	1.30	3.86	2.95	0.21	1.05	2.10	5.00	6.64	5.67
	R	0.05	0.06	0.16	0.93	2.11	4.01	0.09	0.42	0.85	2.01	2.52	3.40
VIS	**GR**	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	P	0.57	1.55	0.28	0.07	0.06	0.05	0.62	1.54	0.14	0.15	0.13	0.14
	V1	1.38	1.86	3.88	0.89	0.78	0.73	1.42	1.27	3.89	2.06	1.77	1.88
	V2	0.83	1.11	2.32	10.62	9.37	8.74	1.19	1.10	3.18	9.68	8.33	8.84
	A	0.19	0.25	0.53	2.43	3.99	2.53	0.50	0.47	1.35	3.78	5.62	4.92
	R	1.24	1.67	3.49	15.99	19.86	21.80	0.65	0.60	1.74	4.97	6.51	8.21
TAU	**GR**	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	P	0.23	1.14	0.13	0.00	0.00	0.00	0.23	1.78	0.00	0.00	0.00	0.00
	V1	0.78	0.53	2.39	0.00	0.00	0.00	0.62	0.67	3.03	1.41	1.41	1.41
	V2	0.29	0.46	0.74	2.65	1.24	0.88	0.35	0.38	1.70	9.32	9.32	9.32
	A	0.08	0.12	0.20	0.71	1.53	0.24	0.06	0.06	0.29	1.59	2.91	2.31
	R	5.26	7.16	14.04	36.38	44.47	46.49	0.02	0.02	0.09	0.49	0.76	2.82

Annexe 2.1

The impact of forest spread on a marginal population of a protected peony (*Paeonia officinalis* L.):

the importance of conserving the habitat mosaic

Emilie Andrieu, John Thompson et Max Debussche

Biodiversity and conservation, sous presse

AUTHOR'S PROOF!

Biodiversity and Conservation (2005) 00:1–16
DOI 10.1007/s10531-005-2357-0

© Springer 2005

The impact of forest spread on a marginal population of a protected peony (*Paeonia officinalis* L.): the importance of conserving the habitat mosaic

E. ANDRIEU*, J.D. THOMPSON and M. DEBUSSCHE
*UMR 5175, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, 1919 Route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 5, France; *Author for correspondence (e-mail: emilie.andrieu@cefe.cnrs.fr; fax: +33-0-467-41-21-38)*

Received 16 March 2005; accepted in revised form 8 August 2005

Key words: Conservation, Dispersal, Habitat heterogeneity, Herbaceous perennial, Land-use change, Reproductive biology

Abstract. In the Mediterranean region of Europe, land-use changes have allowed for rapid colonisation of open habitats by woody species. As a result, it is critical to gather information on how protected species in open habitats respond to forest spread in such areas. Our objective is to quantify whether spatial heterogeneity of the vegetation associated with recent forest closure influences demographic structure and maternal fertility in a population of the protected *Paeonia officinalis* L. In closed woodland, adult plants of *P. officinalis* are almost exclusively vegetative, in open habitats seedlings are rare and on the woodland edge there is a relative over-representation of flowering plants and seedlings. Forest closure dramatically reduces flowering frequency, but has no significant effect on maternal fertility of flowering plants. The spatial aggregation of seedlings close to the maternal plants suggests that dispersal is spatially restricted. Together, these results suggest that the viability of the population requires a transitional habitat between open garrigues or grassland with spaced trees and woodland. A management programme incoporating tree and shrub thinning and cutting of parcels in rotation to maximise the length of the forest edge could maintain a habitat mosaic that favours the persistence of this species in the study site.

Introduction

Land use changes are a major factor causing the erosion of biodiversity, particularly when agricultural intensification, forest cutting, wetland drainage and urban development are involved (Sala et al. 2000). It is less obvious and less well known that important changes in biodiversity are also caused by the abandon of agriculture, grazing and forest cutting. The abandon of traditional agro-sylvo-pastoral activities which have accompanied rural depopulation since the first half of the 20th century, and at an increasing rate since the 1950s, has produced dramatic landscape change in large parts of Europe, particularly in mountains and in the whole Mediterranean region (Carmel and Kadmon 1999; Debussche et al. 1999). Rapid natural colonisation by shrubs and trees of old-fields, grasslands and open shrublands and the closure of open oak woodlands, traditionally coppiced on a 15–20 year rotation for fire-wood and charcoal, has become a prominent feature of the landscape of such areas.

UNCORRECTED PROOF

Rapid and extensive colonisation by woody species and the closure of open woodland have profound implications on ecosystem functioning as fire occurence (Moreno et al. 1998) and water resources (Debussche et al. 1987) and on the population dynamics of plant species of open habitats, clearings and forest edges (Barkham 1980; Valverde and Silvertown 1998; Walck et al. 1999). A critical issue here concerns how such plant species respond to the spread and closure of woodland. Since in the Mediterranean region a large proportion of rare, narrow endemic and protected species are perennial open-habitat species (Lavergne et al. 2004a), forest spread and closure is a critical issue for the conservation of protected plant species.

To document the impact of forest spread and closure on the viability of populations of perennial plants it is necessary to quantify the relative importance and sensibility of different life-cycle stages to forest changes. Several studies have shown that the demographic structure of plant populations, and thus their dynamics, is closely related to habitat heterogeneity, hence the importance of evaluating the impact of land management and land use changes (Maschinski et al. 1997; Buhler and Schmid 2001; Lennartsson and Oostermeijer 2001; Garrido et al. 2003). In herbaceous perennial plants, the different stages of the life-cycle are often assessed by recourse to the identification of distinct morphological classes associated with the seedling, juvenile and reproductive adult stages since it is usually impossible to accurately quantify the age of plants in a population (Rabotnov 1969; Gatsuk et al. 1980).

The overall objective of this paper is to assess the potential impact of forest spread on an ecologically marginal and geographically peripheral population of a protected peony, *Paeonia officinalis* L. (Paeoniaceae) in southern France. The dynamics and viability of a population are best studied by using permanent quadrats containing many plants which are monitored over several years in order to build a demographic model of the study population. However, this approach is time-consuming and cannot be easily undertaken when technical and logistic supports are lacking or when a preliminary diagnosis is urgently needed. To obtain such a preliminary diagnosis we have quantified the proportion of different life-cycle stages in relation to habitat heterogeneity within a single site in order to provide an estimate of the demographic status of the population (Oostermeijer et al. 1994). Based on the analysis of these data we have inferred the demographic trend of the population and possible management strategies.

Peripheral populations in the Mediterranean region may be subjected to high extinction risk as a result of changes in human activities and their impact on natural habitats (Lavergne et al. 2004b). Such populations may also have a distinct genetic make-up as a result of their peripheral nature and occurrence in ecologically different conditions (Thompson 2005). They are thus of particular significance for conservation programmes. A species of open shrublands, clearings and wood edge, *P. officinalis* is a polycarpic long-lived perennial species, like many protected species in France (Chauvet 1987). At the study site, the spread of woody species and forest closure has occurred rapidly in the

UNCORRECTED PROOF

last 50 years. As a result, a mosaic of open woodland, shrubland and dry grassland has been replaced by dense oak woodland with small clearings. The purpose of this study was three-fold: (1) to quantify whether the abundance of different life-cycle stages (an estimator of demographic structure) and the maternal fertility of individual plants are related to spatial variation in the structure of the vegetation, in particular the tree cover, (2) to quantify the spatial distribution of seedlings to estimate dispersal patterns within the population, (3) to propose potential management strategies suitable for the conservation of this marginal population, based on our results.

Materials and methods

Study site

The study site is located on a north-facing limestone slope at 300–350 m a.s.l. (43°46′ N, 3°46′ E), ~20 km north of Montpellier (southern France). The climate is Mediterranean: moist cold winters, annual rainfall of ~1300 mm, mean maxima of the warmest month of 28 °C and mean minima of the coldest month of − 1°C (Debussche and Escarre 1983). The soil is stony and well drained.

Examination of aerial photos taken over the area of the study site in 1946, 1954, 1971 and 2001 illustrates the rapid changes in vegetation structure as reflected by tree and tall shrub cover during 50 years (Table 1). Between 1946 and 1954, the woodland area was coppiced and almost 100% of the study area was probably composed of open habitats just after coppicing. Tree cores of what appear to be among the oldest trees at the site have shown that this coppicing last occurred in 1949 (Andrieu 2002). Since that time there has been no further coppicing and, as a result of re-sprouting by trees present prior to coppicing and the installation of new trees and tall shrubs, the surface occupied by open habitats has been reduced since 1954 by about 30% in 2001. In the remaining open habitats, areas of sparse herbaceous vegetation have been reduced to about 25% of the surface occupied in 1971, as a result of colonisation by grasses and low-growing woody species, a consequence of sheep grazing abandonment. The abandonment of coppicing since 1950 and grazing during the 1970s and the subsequent re-growth and colonisation of woody species has

Table 1. Aerial photo analyses of the changes in vegetation cover and land use at the study site from 1946 to 2001.

Date	Tree and tall shrub cover (%)	Land use
1946	54	Grazing
1949	ca. 0	Coppicing
1954	44	Grazing
1971	52	Grazing
2001	62	Abandoned

UNCORRECTED PROOF

thus caused a generalised spread and closure of woodland in the study area (Debussche et al. 1987; Lepart and Debussche 1992).

Study species

Paeonia officinalis is a protected species under French Law. It occurs in the hills and low mountains of central and southern Europe (Tutin et al. 1993). Four subspecies have been described, of which subspecies *microcarpa* (Boiss. and Reut.) Nyman is the focus of this study. This polycarpic perennial herbaceous geophyte has thick tuberised roots, with flowering stems 30–70 cm in height. Plants may live several decades, although vegetative fragmentation and reproduction is probably quite rare. The pinnatilobate leaves emerge in early spring and die back in summer. Individual plants produce one or several flowering stems, each with a single deep-pink or rose coloured flower. Flowers have 5–10 petals and 80–300 stamens which form a crown around the 1–4 carpels. Each carpel can produce up to 20 black ovoid seeds which are ~8 mm long.

Study population

The study population covers ~1.5 ha in clearings and along the edges of or within previously coppiced evergreen holm oak (*Quercus ilex* L.) woodland. Clearings contain a mosaic of open Mediterranean garrigue with box (*Buxus sempervirens* L.) intermingled with herbaceous plants and low woody shrubs, gravel screes and rock outcrops and clumps of holm oak. The undergrowth of the 3–4 m high holm oak coppice is composed of scattered shrubs of box and of a weak herbaceous cover. In southern France, this population is geographically peripheral (~20 km distant) to those of the Massif Central mountains and the closest to the Mediterranean Sea. This location means that it is also ecologically marginal as it experiences drier and warmer weather during the period of vegetative activity than more northerly populations.

Counts of plants throughout the spatial extent of the *P. officinalis* population in 2002 showed that there are ~2800 plants at the site, but only 100 flowering plants (~3.6%) and 250 one-year-old seedlings (Andrieu 2002). This proportion of flowering plants is weak when compared to the proportion observed in three other populations studied in the same region (range: 5.7–25.8%) (Andrieu et al., unpublished data). According to Oostermeijer (1994) these data also suggest that the study population is in a state of demographic senescence.

Morphological classes

Since it is impossible to precisely age individuals we used age-correlated morphological features to evaluate the demographic structure of the population

UNCORRECTED PROOF

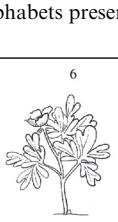
(Rabotnov 1969; Gatsuk et al. 1980). In this way we identified six morphological classes which correlate with variation in demographic state: class 1 and class 2 plants are seedlings; class 3 plants have no stem and a single leaf; class 4–6 plants have a stem and at least 1 leaf and are differentiated by their reproductive status, i.e., no flower bud, an aborted flower bud or a flowering plant, respectively (Table 2). Studies of plants grown from seed (in semi-natural conditions in the study region) have shown that individuals can commence flowering after about 5 years (M. Debussche, unpublished observations).

Sampling methods

Three sampling methods were used in this study: (1) the census of all individuals occurring along five transects, (2) the survey of specific individuals in quadrats along these five transects and additionally across the whole site, and (3) the census of seedling numbers around maternal plants.

To evaluate spatial variation in the demographic structure of the population in relation to the spread of woodland, we recorded the morphological class of all plants present in a 4 m wide band along 5 transects (96, 96, 112, 40 and 136 m long). These transects were positioned to provide a representative sample of the different habitat types at the site. For each transect, woody vegetation cover (> 2 and < 2 m in height) and litter cover were estimated using point quadrats 1 m apart, and at each point the height of the canopy was measured. The transects differed significantly from one another in the height of the canopy (Kruskal Wallis non-parametric analysis of variance, KW = 225.6, $p < 0.001$) and in the presence of woody species, both > 2 and < 2 m in height ($\chi^2_8 = 197.41$, $p < 0.001$) (Table 3). Habermann's analysis of residuals, which identifies the

Table 2. Characterisation of the six morphological classes based on mean (± SE) values of plant height and number of leaves (n = sample size). ■Au: Please define superscript alphabets present in Table 2.■

Morphological class	1	2	3	4	5	6
						
	Stem absent			Stem present		
	All leaflets entire	1 leaflet incised	1 leaflet divided to the basis	Flower bud absent	Flower bud aborted	Flower
Height (cm)	4.4 ± 0.3 [a] (n = 46)	5.3 ± 0.3 [a] (n = 50)	13.1 ± 0.7 [b] (n = 50)	19.0 ± 0.6[a] (n = 50)	26.1 ± 0.8 [b] (n = 52)	31.1 ± 1.2[c] (n = 48)
Leaf number	1	1	1	2.8 ± 0.1[a] (n = 50)	4.4 ± 0.2 [b] (n = 52)	5.8 ± 0.3 [c] (n = 48)

The variation of the height of classes 1–3 and the variation of the height of classes 4–6 are tested separately. Code letters represent significant differences ($p < 0.05$).

PRINTED PROOF

Table 3. Characterisation of the five transects (1–5), ordinated with increasing canopy height, with mean (±SE) values of canopy height and litter and woody vegetation cover. ■Au: Please define superscript alphabets present in Table 3.■

	Open habitats		Edge		Coppice
	1	2	3	4	5
Canopy height (m)	0.52 ± 0.06^{a}	0.66 ± 0.05^{ab}	0.94 ± 0.07^{ab}	0.95 ± 0.18^{b}	3.46 ± 0.12^{c}
Litter cover (%)	23.5	16.9	23.1	20.9	56.5
Woody plant >2 m cover (%)	2.5 (−)	0.0 (−)	7.7 (−)	9.3 (−)	88.0 (+)
Woody plant <2 m cover (%)	58.0	74.7 (+)	82.7 (+)	79.1	91.7 (−)
No woody plant cover (%)	42.0 (+)	25.3 (+)	16.3	20.9	0.0 (−)

Code letters represent significant differences ($p < 0.05$). Observed frequencies significantly ($p < 0.05$) greater or less than expected frequencies are indicated by a + or −, respectively.

categories responsible for a significant χ^2 value (Everitt 1977), showed that transect 5 has a higher cover of woody species >2 m than expected ($p < 0.05$) and the other transects a lower cover of woody species >2 m than expected, and that transects 1 et 2 have a lower cover of woody species (>2 m + <2 m) than expected. In combination with differences in vegetation height on the different transects, these results attest to the presence of three types of habitat at the study site: open habitats (transects 1 et 2), coppice edge (transects 3 et 4) and coppice (transect 5) (Table 3). A total of 576 plants were recorded: 170 in open habitats, 319 on the coppice edge and 87 within the coppice.

To establish the habitat characteristics of each class and the relationship between *Paeonia* reproduction and vegetation structure, we sampled specific individuals in each of the six morphological classes along the five transects in a 10 m wide band. For each class, sampled individuals were located at least 8 m apart. Since this sampling procedure gave a relatively low number of plants in classes 1 and 2, an additional sample of these classes was obtained by randomly sampling the remaining part of the site. As a result of the low number of flowering plants at the site (class 6) all observed flowering plants more than 5 m apart at the site were sampled. A total of 296 plants were studied (46–52 per class). The height and number of leaves on each individual were recorded (Table 2). All data were collected in April–May 2002. Fruit set on flowering plants was quantified in July 2002. To characterise the habitat in which plants of each morphological class were located, a 1 m by 1 m quadrat (centred on each individual) was used to estimate the following habitat characteristics: (a) vegetation height, and the percentage cover of (b) woody species >1 m height, (c) woody species <1 m height, (d) herbaceous species, (e) mosses, (f) litter, (g) bare soil, (h) stones <25 cm size, and (i) stones >25 cm size. In addition, to test for the specificity of a given class habitat, we evaluated the same habitat characteristics on a place where this morphological class is absent studying a second 1 m×1 m quadrat, positioned 3 m distant from each studied plant. The precise

UNCORRECTED PROOF

location of this second quadrat was determined by random sampling among 8 possible cardinal orientations from the first quadrat. If the second quadrat was positioned less than 3 m from a plant of the same morphological class as that in the first quadrat, the sample site was re-sampled. To assess whether maternal fertility of flowering plants is affected by spatial habitat heterogeneity we quantified the number of carpels, the number of seeds, and the number of unfertilised or undeveloped ovules on the flowers of all plants of class 6 in the study. Undeveloped ovules are easy to distinguish from mature seeds since they are much smaller, flatter and reddish rather than being oval-shaped and black. Woodland closure was assessed based on canopy height and percentage cover of woody species (<1 and >1 m in height), herbaceous species and litter.

To provide an indication of seed dispersal distance and direction, the distribution of seedlings (i.e., class 1 and 2 plants) in a radius of 1.5 m around reproductive individuals (class 6) was mapped. In order to detect any competition between the maternal plant and the seedlings, variation in distribution frequency of distances of class 1 and class 2 seedlings from the maternal plant was tested. As sampled class 6 plants were located more than 5 m apart and as very few seedlings were found beyond 2 m from a reproductive plant, we assume that the seed shadows from different sources do not overlap.

Data analysis

χ^2 analyses and Haberman's analysis of residuals were used to compare demographic structure, i.e., the number of plants of each morphological class, among habitat types (open habitats, coppice edge and coppice). In order to test for any significant variation in the types of habitat occupied by different morphological classes, we compared environmental variables (measured within the quadrats) between each plant class with Kruskal Wallis non-parametric analysis of variance, followed by Dunn's test for multiple comparisons. Differences in habitat characteristics for each morphological class and the quadrats located near each plant were examined with a Wilcoxon signed ranks test.

The relation between forest closure (habitat variables: vegetation height, % covers of woody species >1 m height, woody species <1 m height, herbaceous species, and litter), morphological (leaf number and plant height) and reproductive traits (carpel number, ovule number, and seed set) were examined by Spearman Rank Correlation after Bonferroni corrections.

The frequency distributions of distances of class 1 and class 2 seedlings from maternal parents were compared using the asymptotic Kolmogorov–Smirnov two-sample test based on their Empirical Distribution Function in PROC NPAR1WAY in SAS (SAS Institute Inc. 1999). The spatial distribution of class 1 + class 2 seedlings around the probable maternal plant was quantified using the L(r) function, a modify of the Ripley's K function, that allows to test for the null hypothesis of a Poisson process (vs. a regular or an aggregated pattern) in ADE-4 (Ripley 1981; Pélissier and Goreaud 2000). Two *t*-tests were

UNCORRECTED PROOF

performed to test if the seedlings were located downslope the probable maternal plant, i.e., if their y-coordinates are negative and their x-coordinates are not significantly different to 0.

Results

Within the study site, the abundance of the six morphological classes was not evenly distributed across coppice, coppice edge and open habitats ($\chi^2_{10} = 45.3$, $p < 0.001$). Haberman's analysis of residuals showed the following significant ($p < 0.05$) trends (Figure 1): flowering plants (class 6) are more frequent than expected on the coppice edge and less frequent than expected within the coppice, class 1 and class 2 seedlings are more frequent than expected on coppice edge, class 1 seedlings are less frequent than expected within the coppice and in open habitats, plants in class 3 are more frequent than expected within the coppice and less frequent than expected on coppice edge and class 4 plants are more frequent than expected in open habitats.

Analysis of ecological data for the 1 m × 1 m quadrats containing a target plant showed that the habitats of the six morphological classes only differed significantly for one parameter: percentage litter cover (Kruskal Wallis non-parametric analysis of variance; KW = 17.6; $p < 0.01$). This difference was particularly marked for class 3 plants, which occur in habitats with a higher percentage litter cover than plants of class 6 due to the over- and under-representation of these two classes, respectively within the coppice. When

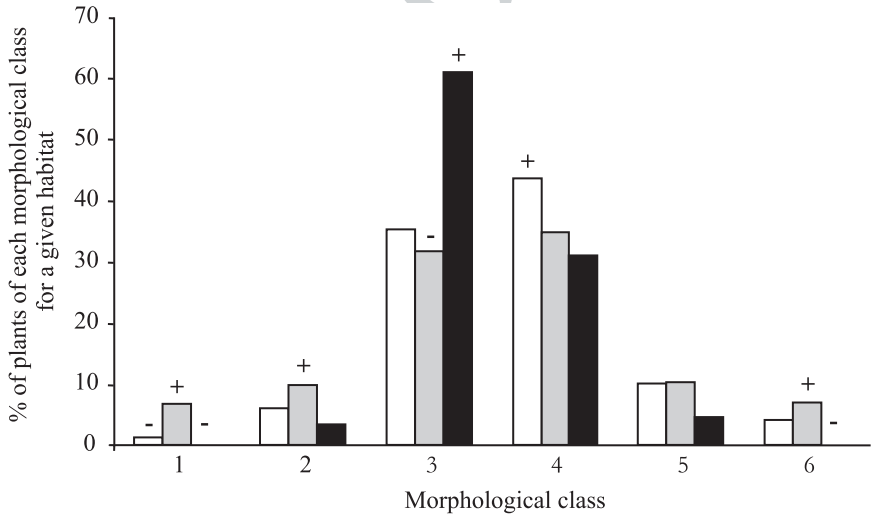


Figure 1. Percentage of each of the six morphological classes in each of the three habitats in the study site, open habitats (open bars, $n = 170$), coppice edge (grey bars, $n = 319$) and within the oak coppice (black bars, $n = 87$). Observed frequencies significantly ($p < 0.05$) greater or less than expected frequencies are indicated by a + or −, respectively.

CORRECTED PROOF

compared with the randomly sampled quadrats (Wilcoxon signed rank test, $p < 0.05$), it was found that the percentage cover of woody species < 1 m was significantly lower for the quadrats containing morphological classes 1–6, and stone (> 25 cm size) cover was lower and herbaceous plant cover was higher for classes 1, 3 and 4.

No significant correlations were found between habitat variables (vegetation height, % covers of woody species > 1 m height, woody species < 1 m height, herbaceous species and litter) and morphological variables (plant height, leaf number). Individuals of classes 4–6 significantly differed in height and leaf number (Kruskal Wallis non-parametric analysis of variance, height: KW = 62.6, $p < 0.001$; leaf number: KW = 82.6, $p < 0.001$). Among these 3 classes, the mature non-flowering plants (class 4) were the smallest and had the lowest number of leaves whereas the flowering plants (class 6) were the tallest and had the highest number of leaves (Table 2). In class 6, no significant correlations were found between morphological and reproductive traits (carpel number, ovule number and seed set). A significant positive correlation was found between carpel number and ovule number ($r = 0.813$, $p < 0.001$). Ovule number and habitat variables were not correlated with seed set. Among the non-mature plants, individuals of class 3 were significantly taller than individuals of classes 1 and 2 (Kruskal Wallis non-parametric analysis of variance, KW = 72.6, $p < 0.001$) (Table 2).

The frequency distribution of spatial distances of class 1 and class 2 seedlings from a maternal plant were not significantly different ($KS_a = 0.69$; $p = 0.72$). The two classes were thus grouped into a single data set, whose frequency distribution was lognormal (shape = 0.5, scale = 3.97, location = 0) (Figure 2). The modal distance of a seedling from a maternal plant was 41.4 cm, with a

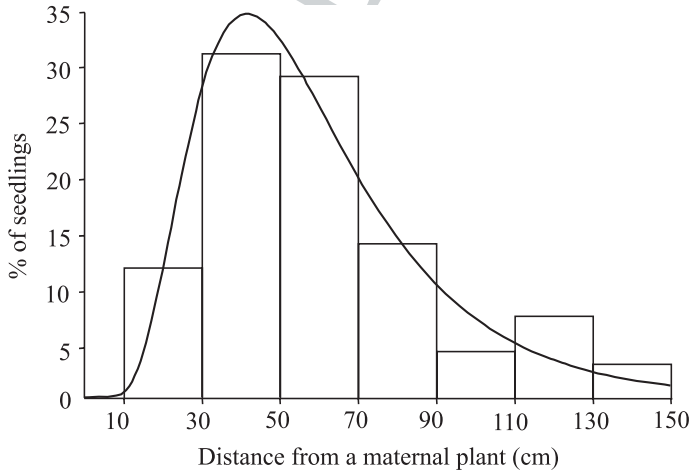


Figure 2. Relative abundance of seedlings (morphological classes 1 and 2, $n = 94$) as a function of distance from a maternal plant. The observed distribution fits a lognormal model (shape = 0.5, scale = 3.97, location = 0).

PROOF

mean of 60.0 ± 31.7 cm. 80.2% of all observed seedlings occurred < 80 cm from a maternal parent. The distribution of seedlings showed a significantly aggregated spatial pattern (L(r) function > 99% confidence interval) around maternal plants. Most seedlings are located immediately down slope from a maternal plant: mean *x*-coordinates are not significantly different to 0 ($t_{93} = -0.66$; $p = 0.51$) and mean *y*-coordinates are significantly < 0 ($t_{93} = -7.7$; $p < 0.001$) (Figure 3).

Discussion

Demographic structure and habitat heterogeneity

Colonisation of open habitats by woody plants and forest closure due to socio-economical and subsequent land-use changes are common features of landscapes in the Mediterranean region (Debussche et al. 1999; Rousset and Lepart 1999, 2002) and may have major consequences for the population ecology of open-habitat plant species. The study population of *P. officinalis* on the slopes of the Pic St Loup in southern France occurs in an area where forests are currently spreading and in a spatially heterogeneous environment, which includes a central large clearing, a coppice edge and a *Q. ilex* coppice. Our snapshot study of demographic structure revealed significant differences in the proportion of seedlings, vegetative adults and flowering individuals among habitat types within the study site. In the clearing there is a significant deficit of

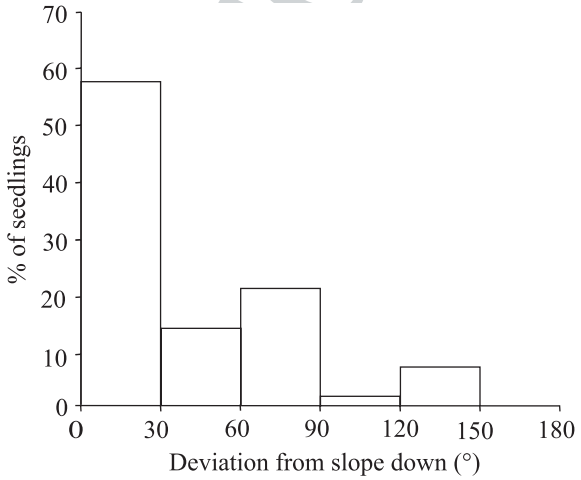


Figure 3. Relative abundance of seedlings (morphological classes 1 and 2, $n = 94$) in relation to their position on the slope relative to the maternal plant. Seedlings which are directly down slope of a maternal plant have a value of 0°, those which are level with the maternal plant have a value of 90° and those directly up slope have a value of 180°. Angles thus represent the position of seedlings according to their deviation from a straight line centred on the maternal plant.

UNCORRECTED PROOF

young seedlings and an over-representation of non-flowering adult plants (class 4) relative to the rest of the site. At the other extreme of the environmental gradient, i.e., in the coppice, there is a significant deficit (in this case absence) of seedlings and flowering plants and a significant over-representation of non-flowering plants (class 3). Finally, in the coppice edge habitat, both seedlings and flowering plants are over-represented and non-flowering individuals (class 3) are significantly under-represented relative to other habitats.

In the open habitat, the under-representation of seedlings points to either poor dispersal into this habitat or reduced germination and/or seedling survival. Given that flowering individuals are well-represented and produce seeds in this habitat, it is unlikely that reduced dispersal contributes to the lack of seedlings, since elsewhere, seedlings can be found within a short distance from flowering plants. The absence of seedlings in this habitat is thus more likely because seed germination and seedling recruitment are compromised, probably by a lack of moisture in the upper layer of the stony soil. Indeed, the importance of micro-environmental variation for the regeneration gap-dependent plants has been stressed in studies of other forest systems (Murray 1986). The over-representation of non-flowering class 4 individuals in open habitat suggests that plants may not flower every year in this part of the site, probably because the period of vegetative activity ceases early in this habitat as a result of high irradiance and soil dryness. This may limit resource acquisition by individual plants, particularly those which flowered in the previous year (Biere 1995), and thus limit flowering. As a consequence, class 4 individuals are likely to be mainly non-flowering adult plants rather than young plants (see also Ne'eman 2003). Both reduced flowering and low germination success may thus limit viability in this habitat as a result of stressful ecological conditions.

In the coppice, the absence of flowering plants indicates that adult plants are restrained to a vegetative condition. The much higher interception of light by vegetation in the coppice (93.41% $\pm$ 0.05, $n = 12$) compared to the open habitat (57.08% $\pm$ 0.15, $n = 18$; E. Andrieu, unpublished data) may prevent *P. officinalis* plants from acquiring sufficient resources to permit flowering in this habitat. Elsewhere it has been shown that intense shading reduces flowering in other *Paeonia* species (Ne'eman 2003) and a range of other species that occur primarily in open woodland and forest gaps (Oostermeijer et al. 1994; Valverde and Silvertown 1995; Walck et al. 1999). In the holm oak coppice there is also an absence of young seedlings, which no doubt results from reduced flowering and perhaps limited dispersal into the coppice. Plants in class 3, which are over-represented in the coppice, may be of diverse origin as their marked variation in size suggests (Table 2). They may be young plants which have not yet flowered, or adult plants which have morphologically regressed, some of them having previously flowered, when the habitat was more open, but which have become vegetative as the forest has closed. The latter may represent 'reproductively dormant' plants which may flower again if the forest is opened, as shown in *P. mascula* (Ne'eman 2003). For a long-lived perennial species such

UNCORRECTED PROOF

as *P. officinalis*, this strategy may allow for rapid flowering within a short time after any opening of the habitat. Indeed, a short duration of the closed coppice stage is an essential element in the maintenance of herbaceous gap species (Barkham 1992; Valverde and Silvertown 1998). Based on data for the early 18th to mid-20th centuries, the coppicing regime at the study site probably involved cutting every 15–20 years (Debussche et al. 2001).

On the coppice edge, ecological conditions represent a transition from woodland to open habitat (Cadenasso et al. 1997). The relatively high abundance of seedlings and flowering plants indicate that the mixture of oak trees and open habitat creates light and soil–water conditions favourable to different stages of the life cycle: i.e., flowering, seed germination and seedling establishment. Moreover, the density of peony individuals on the coppice edge, calculated from the census on the transects, is 2.4 times more important than in the open habitat and 3.3 times more important than in the coppice. These results strongly suggest that the demographic viability of the *P. officinalis* population depends on the presence of a coppice edge habitat. Consequently, the occurrence of irregular edge contours, clumps of oaks within the clearing and gaps in the coppice, i.e., features which promote the occurrence of a coppice edge, should favour the viability of the peony population.

All morphological classes of *P. officinalis*, other than class 3, occur more often in quadrats where there are fewer shrubs (<1 m height) than in randomly sampled quadrats. This result suggests that low shrubs (particularly *Buxus sempervirens*) may compete and exclude *P. officinalis*. Aerial photos of the site attest to the rapid and extensive encroachment of such shrubs following the abandonment of extensive grazing in the later part of the 20th century. In contrast, individuals of morphological class 3 are not significantly concerned by the abundance of shrubs (<1 m height), and moreover they occur in quadrats where the litter cover is relatively high, i.e., in closed coppice. Thus, these plants occur in a more competitive habitat than individuals of other classes. Most of these plants may in fact represent adult plants which have morphologically regressed to a small-sized vegetative stage. Indeed, Ne'eman (2003) has shown that non-flowering individuals of *P. mascula* in dense shade rapidly flower after opening of the canopy, indicative that vegetative individuals of this species are potentially reproductive but constrained to the vegetative stage by local environmental conditions.

Finally, seedlings of morphological class 1 are associated with a habitat where large stones (>25 cm size) and shrubs are relatively absent, and where herbaceous species are abundant. Such habitats are likely to be those in which the burial of seeds (in microsites which may reduce drought stress during germination and early seedling establishment) is favoured. This result suggests that a nurse effect by herbaceous species may facilitate the regeneration of *P. officinalis* at the study site. This may also explain the relative paucity of seedlings in the open habitat and their relatively high abundance on the coppice edge.

UNCORRECTED PROOF

Seedlings and dispersal

The low number of seeds produced per flower (7.4 ± 4.5; $n = 42$) and their frequent persistence within carpels which are held on the stems as they dry through the autumn make it difficult to assess the seed rain and seed shadow around maternal plants in this species (Nathan and Muller-Landau 2000). However, the seed shadow pattern is often similar to the spatial distribution of seedlings, particularly for medium-sized seeds over short distances (Debussche and Isenmann 1994). In addition, within a radius of 1.5 m from maternal plants seeds find a relatively homogeneous environment for germination. We thus assume that the distribution of seedlings around flowering plants fairly accurately reflects the distribution of seed dispersal distances.

The spatial aggregation of seedlings, their markedly greater abundance down slope of flowering plants, and the very small number of seedlings observed at distances >1.5 m from flowering individuals (or individuals which had flowered in the previous year), all suggest that the species is mostly barochorous. These results also suggest that long-distance dispersal in *P. officinalis* is a very rare event and that the colonisation of favourable sites may be limited by poor dispersal.

Towards a conservation strategy

Our study illustrates that the loss of traditional grazing and coppicing practices, a common feature of the Mediterranean back-country (Debussche et al. 1999) may induce a significant modification in local abundance of *P. officinalis* by reducing the spatial extent of patches where it can colonise and reproduce. Elsewhere it has been shown how the long-term persistence of perennial forest herbs depends on the opening of areas suitable for potential colonisation (Valverde and Silvertown 1995). An essential component of conservation strategies for such species thus concerns the maintenance of woodland edge transitions (Murcia 1995) and the maintenance of a mosaic habitat, typical of the Mediterranean landscape. Given the extinction risk faced by peripheral populations in the Mediterranean region (Lavergne et al. 2004b), it is critical to devise conservation strategies for populations such as that in the present study.

In our snapshot study, seedlings and flowering plants were relatively more abundant on the coppice edge than in either clearings or dense woodland. This result suggests that the coppice edge plays a central role for the demographic viability of the study population. Long-term demographic monitoring of permanent quadrats (currently underway) in different parts of the population will be necessary to test the validity of this assumption. However, because long-term studies involving permanent quadrats are time and money consuming and cannot be undertaken for all the species which deserve conservation actions,

UNCORRECTED PROOF

monitoring the morphological stage structure of populations is a valuable first step towards the evaluation of population viability and the potential consequences of different management programmes (Oostermeijer et al. 1994; Buhler and Schmid 2001; Hegland et al. 2001).

Our results suggest that large scale coppicing of the woodland would not be a judicious strategy for conservation management at the study site. Unfortunately, the lack of any spatial aggregation of the individuals of *P. officinalis* makes it difficult to envisage a programme of localised intervention to create small clearings. Thus, we suggest that a strategy involving two phases of management should be adopted. The aim of the first phase would be to rapidly stop the regression of individuals in the woodland before they vanish. Following Ne'eman (2003) and preliminary results of other work on the study species (E. Andrieu, unpublished data) experiments underway showing that many regressed plants can re-flower 2 years after woodland clearing, we propose to thin out holm oaks in the coppice to reduce their cover by ~50%. The second phase (following years) long-term forest management should take into account economic and logistic considerations. In this phase we propose a division of the forest into woodlots, each cut on rotation at different times: roughly 10 parcels each containing a part of the coppice and a part of the clearing could be envisaged. The rotation period for the whole site would be ~20 years in order that the wood which is cut to be sufficiently large to be sold or kept as firewood. Cutting would occur every 4 years in each of two of the 10 parcels, with a spatial design maximising edge length and the heterogeneity of the habitat mosaic. In each parcel, holm oak and evergreen shrubs (e.g., *Buxus sempervirens* L., *Phyllirea media* L.) all able to re-sprout easily, should be cut. Deciduous species, such as *Quercus humilis* Miller, *Amelanchier ovalis* Medik. and *Hippocrepis emerus* L., which are present at the site should be maintained, since they are not in full leaf when the peony population flowers. Such species actually provide a dappled shade during the summer, which may be beneficial to the peony population. Cutting should be performed during the winter to minimise disturbance and damage to the peony population and small branches should be removed. To maximise the efficiency of this conservation strategy we recommend that a partnership between land owners and a nature conservancy organism under the supervision of Conservatoire Botanique National Méditerranéen be implemented.

Acknowledgements

We thank François Munoz and Hélène Fréville for helpful discussion and Annabelle Dos Santos for help with data collection. This study is part of the research programmes of the European Laboratory 'Mediterranean Ecosystems in a Changing World' (C.E.F.E.-C.N.R.S. Montpellier, C.R.E.A.F. Barcelona) and the Long-Term Research Area 'Mediterranean Back-country,' both funded by the C.N.R.S.

UNCORRECTED PROOF

References

Andrieu E. 2002. Conséquences de la dynamique forestière sur la persistance, la reproduction et l'installation d'une espèce végétale polycarpique à longue durée de vie. Le cas de la Pivoine officinale (*Paeonia officinalis* L.). Université Montpellier 2 Sciences et Techniques du Languedoc-Ecole Nationale Supérieure Agronomique Montpellier, Mémoire de D.E.A. Biologie de l'Evolution et Ecologie.

Barkham J.P. 1980. Population-dynamics of the wild daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*). 1. Clonal growth, seed reproduction, mortality and the effects of density. J. Ecol. 68: 607–633.

Barkham J.P. 1992. Population-dynamics of the wild daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*). 4. Clumps and gaps. J. Ecol. 80: 797–808.

Biere A. 1995. Genotypic and plastic variation in plant size – effects on fecundity and allocation patterns in *Lychnis-flos-cuculi* along a gradient of natural soil fertility. J. Ecol. 83: 629–642.

Buhler C. and Schmid B. 2001. The influence of management regime and altitude on the population structure of *Succisa pratensis*: implications for vegetation monitoring. J. Appl. Ecol. 38: 689–698.

Cadenasso M.L., Traynor M.M. and Pickett S.T.A. 1997. Functional location of forest edges: gradients of multiple physical factors. Can. J. Forest Res. 27: 774–782.

Carmel Y. and Kadmon R. 1999. Effects of grazing and topography on long-term vegetation changes in a Mediterranean ecosystem in Israel. Plant Ecol. 145: 243–254.

Chauvet M. 1987. Plantes sauvages menacées de France. In: Lavoisier (ed.), Bilan et Protection. Publication du Bureau des ressources génétiques, Brest.

Debussche M., Debussche G. and Lepart J. 2001. Changes in the vegetation of *Quercus pubescens* woodland after cessation of coppicing and grazing. J. Veg. Sci. 12: 81–92.

Debussche M. and Escarre J. 1983. Carte des isohyètes inter-annuelles dans le Montpelliérais. In: C.E.P.E. L.Emberger, Montpellier. ■Au: Please provide complete details for ref. Debussche and Escarre (1983).■

Debussche M. and Isenmann P. 1994. Bird-dispersed seed rain and seedling establishment in patchy mediterranean vegetation. Oikos 69: 414–426.

Debussche M., Lepart J. and Dervieux A. 1999. Mediterranean landscape change: evidence from old postcards. Global Ecol. Biogeogr. 8: 3–15.

Debussche M., Rambal S. and Lepart J. 1987. Les changements de l'occupation des terres en région Méditerranéenne humide: évaluation des conséquences hydrologiques. Acta Oecol. 8: 317–332.

Everitt B.S. 1977. The Analysis of Contingency Tables. Chapman and Hall, Bristol.

Garrido B., Hampe A., Maranon T. and Arroyo J. 2003. Regional differences in land use affect population performance of the threatened insectivorous plant Drosophyllum lusitanicum (Droseraceae). Divers. Distrib. 9: 335–350.

Gatsuk L.E., Smirnova O.V., Vorontzova L.I., Zaugolnova L.B. and Zhurkova L.A. 1980. Age states of plants of various growth forms: a review. J. Ecol. 68: 675–696.

Hegland S.J., Van Leeuwen M. and Oostermeijer J.G.B. 2001. Population structure of *Salvia pratensis* in relation to vegetation and management of Dutch dry floodplain grasslands. J. Appl. Ecol. 38: 1277–1289.

Lavergne S., Thompson J.D., Garnier E. and Debussche M. 2004a. The biology and ecology of endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. Oikos 107: 505–518.

Lavergne S., Thuiller W., Molina J. and Debussche M. 2004b. Environmental and human factors influencing rare plant local occurrence, extinction and persistence: a 115 years study in the Mediterranean region. J. Biogeogr. 31: in press. ■Au: Please update ref. Lavergne et al. (2004b).■

Lennartsson T. and Oostermeijer J.G.B. 2001. Demographic variation and population viability in *Gentianella campestris*: effects of grassland management and environmental stochasticity. J. Ecol. 89: 451–463.

Lepart J. and Debussche M. 1992. Human impact on landscape patterning: Mediterranean examples. In: Hansen J.A. and di Castri F. (eds), Landscape Boundaries, Consequences for Biotic Diversity and Ecological Flows. Springer, New York, pp. 76–106.

UNCORRECTED PROOF

540 Maschinski J., Frye R. and Rutman S. 1997. Demography and population viability of an endan-
541 gered plant species before and after protection from trampling. Conserv. Biol. 11: 990–999.
542 Moreno J.M., Vazquez A. and Velez R. 1998. Recent history of forest fires in Spain. In: Moreno
543 J.M. (ed.), Large Forest Fires. Backhuys, Leiden, pp. 159–186.
544 Murcia C. 1995. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. Trends Ecol.
545 Evol. 10: 58–62.
546 Murray K.G. 1986. Consequences of seed dispersal for gap-dependent plants: relationships be-
547 tween seed shadows, germination requirements, and forest dynamic processes. In: Estrada A. and
548 Fleming T.H. (eds), Frugivores and Seed Dispersal. Dr W. Junk Plublishers, Dordrecht, pp. 187–
549 198.
550 Nathan R. and Muller-Landau H.C. 2000. Spatial patterns of seed dispersal, their determinants
551 and consequences for recruitment. Trends Ecol. Evol. 15: 278–284.
552 Ne'eman G. 2003. To be or not to be – the effect of nature conservation management on flowering
553 of *Paeonia mascula* (L.) Miller in Israel. Biol. Conserv. 109: 103–109.
554 Oostermeijer J.G.B., Van't Veer R. and Den Nijs J.C.M. 1994. Population structure of the rare,
555 long-lived perennial *Gentiana pneumonanthe* in relation to vegetation and management in the
556 Netherlands. J. Appl. Ecol. 31: 428–438.
557 Pélissier R. and Goreaud F. 2000. ADS in ADE-4. http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/
558 ADSWebUS.html.
559 Rabotnov T.A. 1969. On coenopopulations of perennial herbaceous plants in natural coenoses.
560 Vegetatio 19: 87–97.
561 Ripley B.D. 1981. Spatial Statistics. John Wiley & Sons Inc., New York.
562 Rousset O. and Lepart J. 1999. Evaluer l'impact du pâturage sur le maintien des milieux ouverts. Le
563 cas des pelouses sèches. Fourrages 159: 223–235.
564 Rousset O. and Lepart J. 2002. Neighbourhood effects on the risk of an unpalatable plant being
565 grazed. Plant Ecol. 165: 197–206.
566 Sala O.E., Chapin F.S., Armesto J.J., Berlow E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald E.,
567 Huenneke L.F., Jackson R.B., Kinzig A., Leemans R., Lodge D.M., Mooney H.A., Oesterheld
568 M., Poff N.L., Sykes M.T., Walker B.H., Walker M. and Wall D.H. 2000. Biodiversity – global
569 biodiversity scenarios for the year 2100. Science 287: 1770–1774.
570 SAS Institute Inc. 1999. SAS/STAT User's Guide, Cary.
571 Thompson J.D. 2005. Plant Evolution in the Mediterranean. Oxford University Press, Oxford, UK.
572 Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine
573 D.H., Walters S.M. and Webb D.A. 1993. Flora Europaea. Cambridge University Press,
574 Cambridge.
575 Valverde T. and Silvertown J. 1995. Spatial variation in the seed ecology of a woodland herb
576 (*Primula vulgaris*) in relation to light environment. Funct. Ecol. 9: 942–950.
577 Valverde T. and Silvertown J. 1998. Variation in the demography of a woodland understorey herb
578 (*Primula vulgaris*) along the forest regeneration cycle: projection matrix analysis. J. Ecol. 86: 545–
579 562.
580 Walck J.L., Baskin J.M. and Baskin C.C. 1999. Role of succession, light, nutrients and disturbance
581 on population vigor and maintenance of the rare plant *Solidago shortii* (Asteraceae). Plant Ecol.
582 145: 133–147.
583
584
585
586

UNCORRECTED PROOF

Annexe 2.2

Size-dependent reproduction and gender modification in the hermaphroditic perennial plant *Paeonia officinalis*

Emilie Andrieu, Max Debussche et John Thompson

Soumis

Size-dependent reproduction and gender modification in the hermaphroditic perennial plant *Paeonia officinalis*

EMILIE ANDRIEU, MAX DEBUSSCHE AND JOHN D. THOMPSON

UMR 5175, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, 1919 Route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 5, France.

Correspondence: Emilie Andrieu (e-mail: emilie.andrieu@cefe.cnrs.fr)

Summary

1 In this study we quantify how reproduction and allocation to male and female function vary in relation to plant size during two consecutive but contrasting reproductive seasons in the hermaphroditic perennial herb *Paeonia officinalis*.

2 Small flowering individuals in 2003 did not flower in 2004, flowering probability is thus related to size, with an emphasis on survival in small plants.

3 In terms of absolute numbers of stamens and ovules, large plants allocated more resources to reproduction than small plants by the production of additional flowering stems. In contrast, in terms of relative allocation, large plants allocated fewer resources to reproduction than small plants, and may thus be less prone to costs of reproduction.

4 Significant size-dependent gender modification occurred only in the second year of the experiment, when larger plants were more female than small plants. Hand pollinations performed to minimise external effects on seed set and a severe drought in 2003 may have contributed to sex allocation costs in small plants.

5 Our results suggest that differential expression of between-year reproductive costs in relation to plant size may lead to size-dependent reproduction and be a key feature driving size-dependent gender modification in perennial plants.

*Key-words***:** herbaceous perennial, gender, resource allocation, flowering, costs of reproduction, drought stress.

Introduction

A major goal of evolutionary ecology is to explain how organisms maximise fitness relative to other individuals in a population. In plants, fitness estimation requires quantification of relative investment in reproduction, in particular the relative allocation to male and female function, which in perennial species may vary among years in relation to pollen and resource availability, plant size and age and costs of prior reproduction (Charnov 1982).

Plant size is a key element in the expression of reproductive trait variation in herbaceous perennial plant populations. First, increasing size may increase the probability of flowering in a given year (Gross 1981; Hanzawa & Kalisz 1993; Worley & Harder 1996), with a threshold size for reproduction that increases in favourable conditions (Wesselingh *et al.* 1997; Méndez & Karlsson 2004). Second, reproductive biomass and seed production may be size-dependent (Samson & Werk 1986; Méndez & Obeso 1993), and several studies report an increase in absolute allocation to sexual reproduction in relation to plant size (Ohlson 1988; Worley & Harder 1996; Wright & Barrett 1999). Third, the gender of plants, i.e. their relative allocation to male and female function, can be size-dependent with either an increase in allocation to female (Wright & Barrett 1999; Méndez & Traveset 2003; Litrico *et al.* 2005) or male (Bickel & Freeman 1983; Ackerly & Jasieński 1990) function with size. Such gender bias may be particularly frequent in resource poor environments (Delph & Wolfe 2005; Litrico *et al.* 2005), or after environmental stress (McArthur 1977; McArthur & Freeman 1982).

In perennial plant species, size-dependent reproduction and gender variation may be key elements of an adaptive response to temporal environmental variation, in which a polycarpic plant maximises its lifetime fitness. In perennials, natural selection should favour a genetically determined strategy which adjusts both flowering probability and total and relative allocation to male and female function in relation to size and local conditions (Klinkhamer *et al.* 1997; Zhang & Jiang 2002). However, a lack of joint studies of flowering probability and resource allocation in relation to size in different reproductive seasons limits our understanding of the potential significance of an integrated response concerning size-dependent reproduction and gender modification in perennial plants.

The purpose of this paper is to quantify the effect of plant size on reproduction and

sex allocation in the perennial hermaphrodite *Paeonia officinalis* L. (Paeoniaceae). We studied the same individuals over two consecutive years in a single population. The two years experienced very different climatic regimes (details below): basically during the first year, flowering and fruiting occurred during an exceptionally hot and dry period, hence the probability of reproduction and allocation patterns in 2004 may have been influenced by prior drought stress. We examined the following questions: (1) Is flowering probability related to plant size? (2) Do patterns of absolute and relative sex allocation depend on plant size? (3) Does the pattern of size-dependent sex allocation vary among years?

Materials and Methods

STUDY SPECIES

Paeonia officinalis L. is an herbaceous perennial plant which occurs in the hills and low mountains of central and southern Europe (Tutin *et al.* 1993), and is protected in France. This polycarpic geophyte has thick tuberised roots and individuals may live several decades. Herbaceous stems appear in early spring, bear 1-11 pinnatilobate leaves, and die back in late summer. In the study population, reproductive individuals produced 1 - 4 flowering stems, each 30-70 cm height, the majority (79.7 %, n = 182) with a single flowering stem. Each flowering stem bears a single large hermaphroditic flower. In the study population, plants flowered from mid-April to mid-May and individual flowers lasted ~ 6 days. Flowers have 5-10 pink coloured petals and 80-300 stamens which form a crown around the 1-4 carpels. They do not produce nectar and attract generalist pollinators (mainly large Hymenoptera, Apoideae) which collect pollen. In July, each dehiscent follicle exposes up to 20 black 7-9 mm long ovoid seeds. Individuals can produce a small number of seeds on selfing, albeit significantly less than on outcrossing, and a three-year comparison of fertility on natural and supplementary pollinated plants produced no evidence of pollen limitation in the study site (E. Andrieu *et al*., unpublished manuscript).

STUDY SITE

The study was carried out from April to July 2003 and 2004 in a population on the Montagne de la Séranne, (43° 49’ N, 03° 33’ E, 500-650 m a.s.l.), 35 km north-west of Montpellier

(southern France). The site is located on limestone, on west facing slopes with stony soils and gravel screes. The climate is classified as perhumid Mediterranean with cold winters (Daget 1977). The main vegetation is shrubs (*Buxus sempervirens* L., *Amelanchier ovalis* Medik., *Viburnum lantana* L., *Prunus mahaleb* L.) and deciduous oak (*Quercus humilis* Mill.) with clearings and a sparse herbaceous cover.

In 2003, the study region experienced a warmer spring than usual, with mean daily temperature maxima for April and May 1 - 2 °C above average, and an exceptionally hot summer with mean daily temperature maxima for June, July and August 3 - 6.5 ° C above the average of historical records (n = 27 yrs; Le Caylar meteorological station, at a similar altitude, 20 km from the study site). In addition, the May-August period was much drier than usual, with a probability of recurrence of once every 8 years (n = 58 yrs; St Maurice-de-Navacelles meteorological station, 4 km distant from the study site). In 2004, spring and summer temperatures were close to average, except for June which was 3°C warmer than average.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

In April 2003, 40 flowering plants (in a single large clearing and adjacent smaller clearings) were randomly chosen to study sex allocation and constituted a representative sample of the number of flowering stems per plant in the studied population. To estimate potential seed production (female function) unbiased by any effects of pollen limitation, all flowers of each plant were hand-pollinated in 2003 and 2004 using a mix of pollen collected from different individuals ($n \geq 4$) outside the study sample. Hand-pollination was performed three times by brushing pollen onto the stigma every two days until flowers wilted.

In geophyte species, aerial biomass is proportional to underground biomass and is thus a good surrogate for total biomass (Hanzawa & Kalisz 1993; Worley *et al.* 2000). Plant size was estimated from leaf surface area measurements to avoid the destruction of individuals, (our study lasted two successive years and involved a protected species). We measured leaflet length and width on all leaves of each stem on each individual to estimate total leaf surface area per stem and per plant. In order to test whether leaf surface area per plant was correlated with leaf biomass, in 2003 we sampled (with permission) 30 individuals on which

we measured the length and the width (± 1 mm) of each leaflet of one randomly chosen leaf. Leaves were weighed (± 0.1 mg) after oven drying for one week at 60°C. Leaf surface area (i.e. the sum of all values of leaflet length x width) was closely correlated with leaf dry weight ($r_{Sp} = 0.923$, $p < 0.001$).

To estimate female reproductive function, we counted the number of carpels, ovules and seeds per flower. Male fertility was estimated by counting anther number per flower and pollen grain number per anther. We counted anther number per flower using digital photos: a method shown to be accurate by linear regression of direct anther count (d) on picture anther count (p) for 32 flowers outside the study sample ($d = 1.12\,p$, $r^2 = 0.99$, $p < 0.001$). Prior to dehiscence, we removed a sample of 10 anthers per studied flower for pollen counts using a Casy Model TT cell counter with a 150 µm aperture capillary. Anthers were left in open 1.5 mL polypropylene centrifuge tubes in a dry and warm place to release pollen. Tubes were thus filled with distilled water and placed for 10 min in an ultrasonic bath to further promote pollen release. Anthers were then removed and ¼ of each tube was transferred to a vat filled with 5 mL of CASYton® (isotonic dilution liquid). Pollen grains were then counted from three 400 µL aliquots (parameters of the curve smoothing: step = 2, width = 8), and mean values used to estimate the number of pollen grains per anther.

SEX ALLOCATION

Phenotypic gender was estimated using the formula of Lloyd & Bawa (1984), which calculates standardized femaleness (G_i) of an individual i in a population of n individuals as:

$$G_i = d_i / (d_i + l_i \times E) \qquad (1)$$

where d_i is an estimate of female allocation based on ovule or seed number and l_i an estimate of male allocation (based on anther number); the equivalence factor E is the ratio of female to male allocation in the population as a whole:

$$E = \sum_{i=1}^{n} d_i \Big/ \sum_{i=1}^{n} l_i \qquad (2)$$

Since pollen grain number per individual is derived from a multiplication of the mean pollen grain number per anther by anther number, estimates of gender were based on anther number in relation to ovule number (G_o) or seed number (G_s). We did not use pollen grain number since it closely depends on anther number. We assessed variation in standardized relative

gender in relation to variation in total reproductive investment (Sarkissian *et al.* 2001). In both study years, Spearman rank correlations were calculated to analyse the relationship between plant size (i.e. leaf surface area) and sex allocation. All statistical analyses were performed using Statistica (StatSoft France 2005). A sequential step-down Bonferroni procedure was used to correct threshold values for significance testing with multiple comparisons. Occasional predation of floral structures caused sample sizes to differ from the number of plants in the total sample of each year.

Results

In both years of the study, carpel, ovule, seed and anther numbers were significantly correlated with overall plant size (Table 1). These correlations were not significant when analysed at the level of individual flowering stems for the two years of the study (Table 1). Likewise, a separate analysis of flowers on the first flowering stem only produced no significant correlation (results not shown since they are a part of those in Table 1). Thus the increase in absolute reproductive allocation with increasing plant size is primarily the result of plants producing additional flowers (Fig. 1).

Relative allocation to reproduction decreased with plant size, both in terms of female and male function (Fig. 2): the number of ovules / leaf surface area declined with leaf surface area (r_{Sp} = -0.38, $p < 0.05$), as did the number of anthers / leaf surface area (r_{Sp} = -0.63, $p < 0.001$). However, for male and female functions, the regression slopes for log (pollen / ovule) or log (pollen / seed) on log leaf surface area per plant were not significantly different from zero in 2003 (pollen / ovule: *slope* = 0.13, $p > 0.05$; pollen / seed: *slope* = 0.05, $p > 0.05$). The increase in pollen grain number and ovule number with size thus did not differ significantly. Similar results were obtained at the flowering stem level (data not shown). In 2003 (year 1), estimates of phenotypic gender of individuals were uncorrelated with plant size (G_o: r_{Sp} = 0.15, $p > 0.05$; G_s: r_{Sp} = 0.27, $p > 0.05$; n = 38). In contrast, in 2004 (year 2), both G_o (r_{Sp} = 0.51, $p < 0.01$; n = 28) and G_s (r_{Sp} = 0.42, $p< 0.05$; n = 28) increased with plant size, suggesting an increase in the relative femaleness of larger flowering plants.

Variation in sex allocation among years was not associated with differences in the proportion of individuals with 1, 2, 3 or 4 flowering stems, which showed no significant

variation over the two years ($X^2_3 = 3.45$, $p > 0.05$). Analysis of trait variation per flowering stem using Wilcoxon signed rank tests showed a significant decline in the number of seeds per flower ($T = 17$, $Z = 3.14$, $p < 0.05$) and the number of pollen grains per anther ($T = 1$, $Z = 3.88$, $p < 0.05$) in 2004 relative to 2003, but no significant variation between years for leaf surface area per stem ($T = 85$, $Z = 1.06$, $p > 0.05$), or the number of ovules ($T = 56$, $Z = 1.83$, $p > 0.05$) and anthers ($T = 90$, $Z = 0.56$, $p > 0.05$) per flower.

In 2004, 21 of the 37 study plants flowered whilst 16 became vegetative. Plants that were small in 2003 remain small in 2004 and mainly became vegetative whereas large plants remain large and flowered again. Indeed, the size in 2003 of those individuals which flowered in 2004 was significantly greater than the size in 2003 of those individuals which became vegetative in 2004 (Mann–Whitney $U = 66$, $p < 0.01$) (Fig. 3a). In 2004, the size of those individuals which flowered was significantly greater than the size of those individuals which had become vegetative ($U = 72$, $p < 0.01$) (Fig. 3b). The size of individuals which flowered in 2003 and became vegetative in 2004 did not differ significantly among years (Wilcoxon signed-rank tests $T = 81$, $p > 0.05$), neither did that of individuals which flowered in both years ($T = 53$, $p > 0.05$). The variances in size of reproductive plants in 2003 and reproductive plants in 2004 were not significantly different (Levene's test, $F = 0.60$, $p > 0.05$). In 2003, there was no significant difference at the flowering stem level in anther number ($U = 124$, $p > 0.05$) or ovule number ($U = 140.5$, $p > 0.05$) for plants which either became vegetative or flowered again in 2004. However, individuals which flowered in 2004 had significantly ($U = 87$, $p < 0.05$) more pollen grains per anther in 2003 (120225 ± 13692) than did individuals which became vegetative (73202 ± 13200) and significantly ($U = 92$, $p < 0.05$) more seeds per flowering stem (15.2 ± 1.8) than individuals which became vegetative in 2004 (8.9 ± 1.1). Although the G_o in 2003 of the two groups was not significantly different ($U = 167$, $p > 0.05$), the mean G_s in 2003 of plants which flowered again in 2004 (0.52 ± 0.02) was significantly greater ($U = 102.5$, $p < 0.05$) than that of plants which became vegetative in 2004 (0.41 ± 0.03 in 2003) (Fig. 4a & b).

Discussion

Our study provides strong evidence for size-dependent reproduction and sex allocation in

a perennial plant. The patterns of temporal variation across years we detected provide an original demonstration of the links between size-related variation in flowering probability and sex allocation and re-emphasize the need to conduct repeated studies of flowering and gender for the true nature of variation in sex allocation to be assessed in perennial plants

The modular growth pattern of plants allows for variation in reproductive allocation both within flowers and at the whole plant level. In *P. officinalis*, increased absolute allocation to reproduction with increased size is due to increased flower number and not to increased allocation to reproductive components per flower. This is despite the highly variable number of ovules and anthers in *P. officinalis* flowers, which in other species is associated with gender vartiation at the flower level (Wright & Barret 1999; Méndez & Traveset 2003). In the *P. officinalis* population we studied, smaller flowering plants in 2003 tended to become vegetative in 2004 whereas larger flowering plants in 2003 tended to flower again in 2004. Flowering plants were thus larger than non-flowering plants in 2004 (see also Andrieu *et al*. 2006). These results provide further evidence for a size-dependent threshold for reproduction (see also Harper 1977; Gross 1981; Hanzawa & Kalisz 1993; Méndez & Obeso 1993).

We observed significant variation in absolute and relative patterns of sex allocation in the two years of study. First, seed production showed a significant decline in 2004 relative to 2003. Second, we detected no evidence of size-dependent gender modification in 2003, whereas in 2004, larger plants allocated relatively more resources to female function than small plants. In 2004, one plant even had zero seed production (despite supplementary pollination) and thus acted completely as a male in that year. In 2003, differences in past history may have created different categories of small-sized plants, some of which may not affect femaleness. In addition, the thick tuberised roots of *P. officinalis* may provide a stock of resources that buffers the resource trade-off necessary for the expression of size-dependent gender variation in the absence of stressful conditions. It is however unlikely that a difference in statistical power caused variation in the expression of significant patterns since the variances in size of reproductive plants were not significantly different in the two years.

In our study, two factors may have caused resource limitation and stress to affect both gender variation in 2004 and flowering probability in a size-dependent manner. First, the summer of 2003 was exceptionally hot and dry compared to historical records (see methods).

Drought stress has been identified as a key factor causing sex allocation costs, particularly in large-flowered species (Galen 2000), such as *P. officinalis*. Indeed, in the Mediterranean region, the summer drought may contribute to variation in reproductive traits and create trade-offs favouring gender modifications (Thompson 2005 and references therein). Second, hand pollinations were done in 2003 to minimise variation in seed set due to external factors. This pollination will also tend to maximise seed production which may cause a cost in terms of subsequent reproduction.

Our results strongly suggest that larger plants were able to buffer any reproductive costs and the environmental stress in 2003 and thus both flower and maintain levels of allocation to female function in 2004, thus creating a pattern of size-dependent gender variation in 2004. This may be permitted by their reduced relative allocation to sexual reproduction compared to smaller plants. The general reduction in seed production in our study sample, and the reduced relative female allocation and flowering of small plants that we observed suggest an emphasis on survival during or after stressful periods in small plants. Indeed, in perennial species smaller plants are likely to be more prone to mortality than larger plants (Svensson *et al*. 1993), and would thus be expected to favour survival at the expense of reproduction in response to stress. Size-dependent flowering and gender modification observed in our study species in 2004 may thus result from the differential expression on small and large plants of the cost of reproduction and/or prior environmental stress.

In conclusion, our results support the idea that plant size may play a key role in the expression of the costs of reproduction in perennial plants (Obeso 2002) and provide an original demonstration of the link between size, flowering probability and gender variation. Indeed, the differential expression of between-year reproductive costs in relation to plant size may be a key feature driving size-dependent gender modification in perennial plants. This variation in the expression of size-dependent gender modification in *P. officinalis* adds to the growing evidence for gender plasticity on individual plants (Dorken & Barrett 2004; Ehlers & Thompson 2004; Gonzalez *et al.* 2005; Litrico *et al.* 2005). By virtue of its potential positive effect on survival, plasticity in reproductive allocation may be part of an adaptive strategy in perennial hermaphrodite plants (Zhang & Jiang 2002) that enhances persistence during stressful conditions. The patterns we detected are based on a descriptive study of flowering

and sex allocation; current longer-term experimental demographic work will provide more precise information on the mechanisms causing reproductive trait variation in *P. officinalis*.

Acknowledgements - This study is part of the European programme "Mediterranean Mountain Ecosystems in a Changing World" and of the programme of the Long-Term Research Area "Mediterranean Backcountry", both funded by the C.N.R.S. We thank Adeline André, Laure Andrieu, Annabelle Dos Santos and Marta Galloni for help with data collection, and staff at the IRD Montpellier, particularly Philip Agnew for access to and help with the particle counter. Thanks also go to Mr and Mrs Buresi for access to their land and two anonymous referees for their helpful comments on a preliminary version of the manuscript.

References

Ackerly, D. D. & Jasieński, M. (1990) Size-dependent variation of gender in high density stands of the monoecious annual, *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae). *Oecologia*, 82, 474-477.

Andrieu, E., Debussche, M. & Thompson, J. D. (2006) The impact of forest spread on a marginal population of a protected peony (*Paeonia officinalis* L.): the importance of conserving the habitat mosaic. *Biodiversity and Conservation*, in press.

Bickel, A. M. & Freeman, D. C. (1983) Effects of pollen vector and plant geometry on floral sex ratio in monoecious plants. *American Midland Naturalist,* 130, 239-247.

Charnov, E. L. (1982) The theory of sex allocation. Princeton University Press (Princeton, New Jersey).

Daget, P. (1977) Mediterranean bioclimate - General characteristics and modes of definition. *Vegetatio*, 34, 1-20.

Delph, L.F. & Wolf, D.E. (2005) Evolutionary consequences of gender plasticity in genetically dimorphic breeding systems. *New Phytologist*, 166, 119-128.

Dorken, M. E. & Barrett, S. C. H. (2004) Phenotypic plasticity of vegetative and reproductive traits in monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae): a clonal aquatic plant. *Journal of Ecology,* 92, 32-44.

Ehlers, B. K. & Thompson, J. D. (2004) Temporal variation in sex allocation in

hermaphrodites of gynodioecious *Thymus vulgaris* L. *Journal of Ecology,* 92, 15-23.

Galen, C. (2000) High and dry: Drought stress, sex-allocation trade-offs, and selection on flower size in the alpine wildflower *Polemonium viscosum* (Polemoniaceae). *American Naturalist,* 156, 72-83.

Gonzalez, C., Ornelas, J. F. & Jimenez, L. (2005) Between-year changes in functional gender expression of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated shrub. *Annals of Botany,* 95, 371-378.

Gross, K. L. (1981) Predictions of fate from rosette size in four 'biennial' plant species: *Verbascum thapsus, Oenothera biennis, Daucus carota*, and *Tragopogon dubius*. *Oecologia,* 48, 209-213.

Hanzawa, F. M. & Kalisz, S. (1993) The relationship between age, size, and reproduction in *Trillium grandiflorum* (Liliaceae). *American Journal of Botany,* 80, 405-410.

Harper, J. L. (1977) Population biology of plants. Academic Press (London).

Ishii, H. S. (2004) Increase of male reproductive components with size in an animal-pollinated hermaphrodite, *Narthecium asiaticum* (Liliaceae). *Functional Ecology,* 18, 130-137.

Klinkhamer, P. G. L., de Jong, T. J. & Metz, H. (1997) Sex and size in cosexual plants. *Trends in Ecology & Evolution,* 12, 260-265.

Litrico, I., Pailler, T. & Thompson, J. D. (2005) Gender variation and primary succession in a tropical woody plant, *Antirhea borbonica* (Rubiaceae). *Journal of Ecology***,** 93, 705-715.

Lloyd, D. G. & Bawa, K. S. (1984) Modification of the gender of seed plants in varying conditions. *Evolutionary Biology,* 17, 255-338.

McArthur, E. D. (1977) Environmentally induced changes of sex expression in *Atriplex canescens*. *Heredity,* 38, 97-103.

McArthur, E. D. & Freeman, D. C. (1982) Sex expression in *Atriplex canescens*: genetics and environment. *Botanical Gazette,* 143, 476-482.

Méndez, M. & Karlsson, P. S. (2004) Between-population variation in size-dependent reproduction and reproductive allocation in *Pinguicula vulgaris* (Lentibulariaceae) and its environmental correlates. *Oikos,* 104, 59-70.

Méndez, M. & Obeso, J. R. (1993) Size-dependent reproductive and vegetative allocation in *Arum italicum* (Araceae). *Canadian Journal of Botany,* 71, 309-314.

Méndez, M. & Traveset, A. (2003) Sexual allocation in single-flowered hermaphroditic individuals in relation to plant and flower size. *Oecologia,* 137, 69-75.

Obeso, J. R. (2002) The costs of reproduction in plants. *New Phytologist,* 155, 321-348.

Ohlson, M. (1988) Size-dependent reproductive effort in three populations of *Saxifraga hirculis* in Sweden. *Journal of Ecology,* 76, 1007-1016.

Samson, D. A. & Werk, K. S. (1986) Size-dependent effects in the analysis of reproductive effort in plants. *American Naturalist,* 127, 667-680.

Sarkissian, T. S., Barrett, S. C. H. & Harder, L. D. (2001) Gender variation in *Sagittaria latifolia* (Alismataceae): Is size all that matters? *Ecology,* 82, 360-373.

StatSoft France (2005) Statistica 7.1.

Stocklin, J. & Favre, P. (1994) Effects of plant size and morphological constraints on variation in reproductive components in two related species of *Epilobium. Journal of Ecology,* 82, 735-746.

Svensson, B. M., Carlsson, B. A., Karlsson, P. S. & Nordell, K. O. (1993) Comparative long-term demography of three species of *Pinguicula*. *Journal of Ecology,* 81, 635-645.

Thompson, J. D. (2005) Plant evolution in the Mediterranean. Oxford University Press (Oxford).

Tutin, T. G., Burges, N. A., Chater, A. O., Edmondson, J. R., Heywood, V. H., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M. & Webb, D. A. (1993) Flora Europaea, vol. I, *second edn*. Cambridge University Press (Cambridge).

Wesselingh, R. A., Klinkhamer, P. G. L. & de Jong, T. J. (1997) Threshold size for flowering in different habitats: efects of size-dependent growth and survival. *Ecology,* 78, 2118-2132.

Worley, A. C. & Harder, L. D. (1996) Size-dependent resource allocation and costs of reproduction in *Pinguicula vulgaris* (Lentibulariaceae). *Journal of Ecology,* 84, 195-206.

Worley, A. C., Baker, A. M., Thompson, J. D. & Barrett, S. C. H. (2000) Floral display in *Narcissus*: variation in flower size and number at the species, population and individual level. *International Journal of Plant Science***,** 161, 69-79.

Wright, S. I. & Barrett, S. C. H. (1999) Size-dependent gender modification in a

hermaphroditic perennial herb. *Proceedings of the Royal Society of London* Series B-Biological Sciences, 266, 225-232.

Zhang, D. Y. & Jiang, X. H. (2002) Size-dependent resource allocation and sex allocation in herbaceous perennial plants. *Journal of Evolutionary Biology,* 15, 74-83.

Table 1. Spearman rank correlations between plant size (leaf surface area) and reproductive traits at the plant, flowering stem and within-flower levels.

Level		Number	2003				2004			
			n	*r*	$t_{(n-2)}$	*p*	*n*	*r*	$t_{(n-2)}$	*p*
Plant		carpels	39	0.58	4.31	< 0.001*	28	0.78	6.41	< 0.001*
		ovules	37	0.55	3.92	< 0.001*	28	0.67	4.54	< 0.001*
		seeds	38	0.62	4.75	< 0.001*	28	0.64	4.20	< 0.001*
		anthers	40	0.58	4.38	< 0.001*	28	0.53	3.20	0.004*
Flowering stem		carpels	39	0.16	0.97	0.337	28	0.44	2.50	0.019
		ovules	38	0.29	1.81	0.078	28	0.33	1.81	0.082
		seeds	38	0.40	2.65	0.012	28	0.35	1.88	0.072
		anthers	39	0.33	2.09	0.043	28	0.18	0.92	0.364
Whithin-flower	Carpel	ovules	38	0.29	1.81	0.079	28	-0.05	-0.24	0.816
		seeds	38	0.31	1.92	0.062	28	0.10	0.50	0.621
	Anther	pollen grains	38	0.21	1.27	0.212	28	0.10	0.50	0.618

* Significant after step-down sequential Bonferroni correction ($p < 0.05$).

Figure legends

Fig. 1. Relationship between plant leaf surface area and both anther number and ovule number at the whole plant (A and B) and flowering stem (C and D) levels in 2003. Filled diamonds - 1 flowering stem; empty diamonds - 2 flowering stems; filled squares - 3 flowering stems; open squares - 4 flowering stems). Results of correlation tests are in Table 1.

Fig. 2. Relative allocation to reproductive traits in relation to plant size in 2003: (A) number of ovules / leaf surface area, (B) number of anthers / leaf surface area.

Fig. 3. Plant size (mean ± SE of leaf surface area) according to the status of individual plants in 2004 (flowering $n = 21$ or vegetative $n = 16$): (A) size of all flowering individuals in 2003 which either flowered or became vegetative in 2004; (B) size of vegetative and flowering individuals in 2004.

Fig. 4. Gender of flowering plants based on ovule number (G_o) on the left (A, C) and seed number (G_s) on the right (B, D). A, B: the gender of plants in 2003 in relation to their fate in 2004, i.e. those which flowered again in 2004 (open squares) compared with those which became vegetative in 2004 (filled squares). C, D: a comparison of the gender of plants which flowered in 2003 (open diamonds) with plants which flowered in 2004 (filled diamonds). Plants acting only as males have a gender of 0 and plants acting only as females would have a gender of 1.

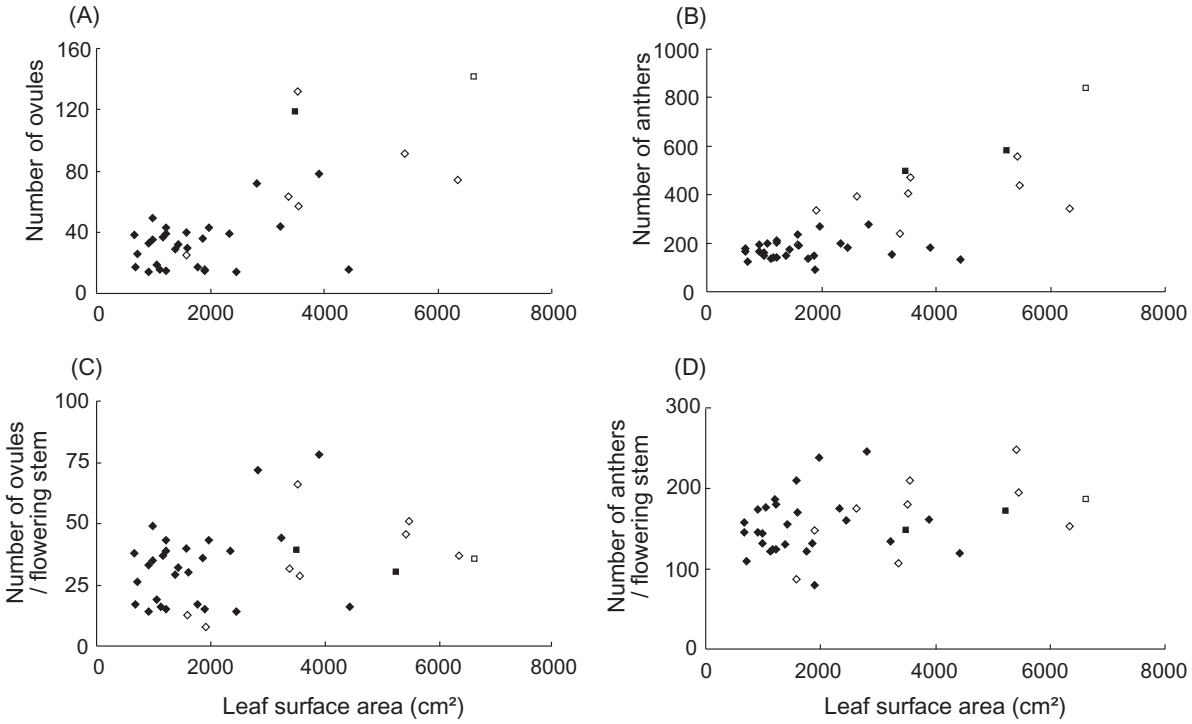


Figure 1

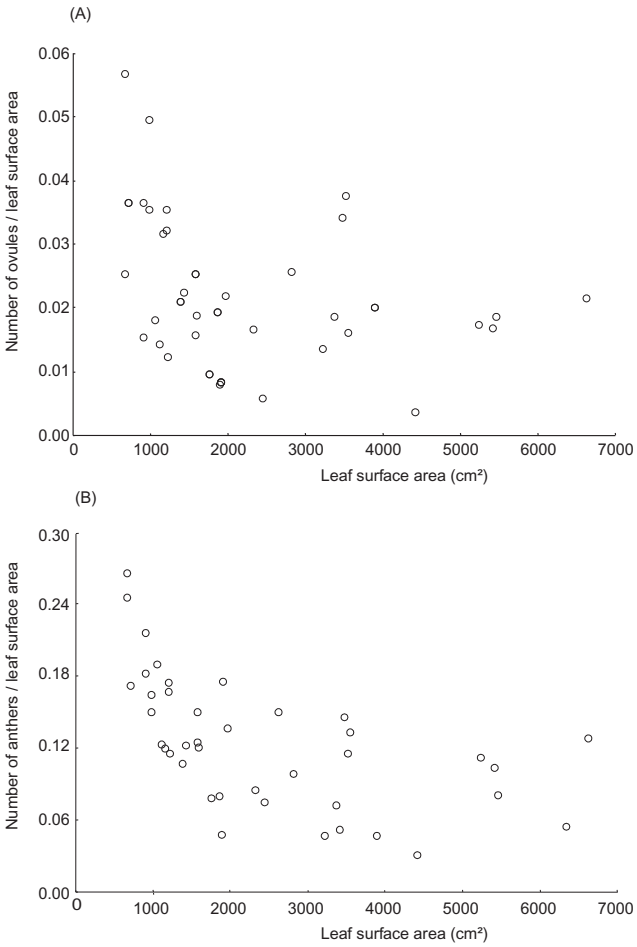


Figure 2

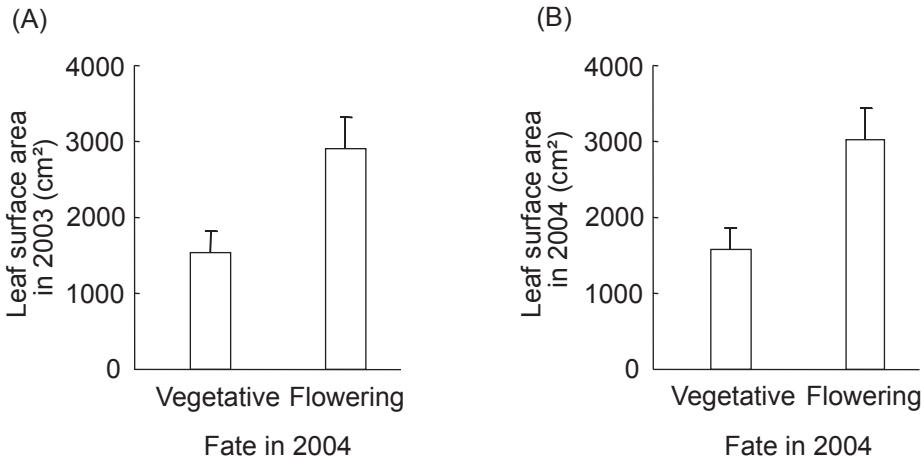


Figure 3

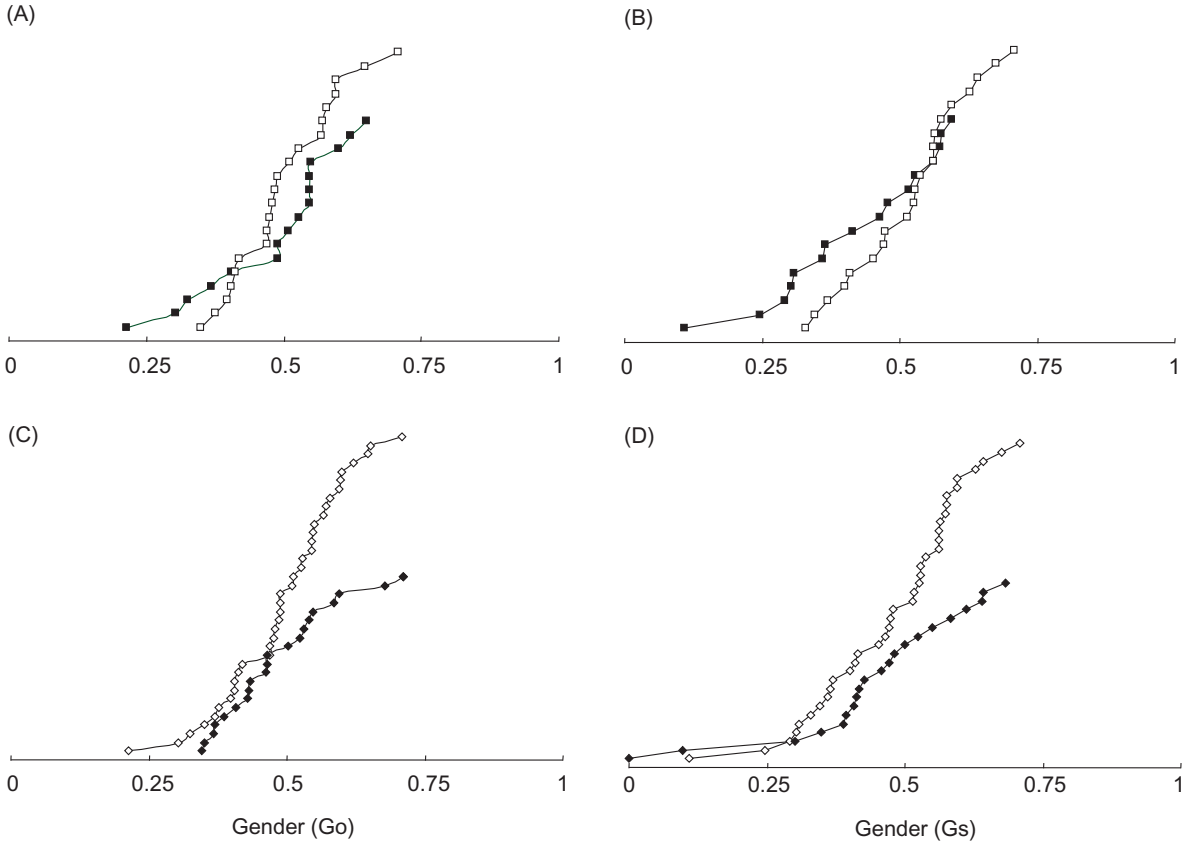


Figure 4

Annexe 2.3

Exploring the limitations on maternal fertility in perennial plants: a three year experimental study of the protected *Paeonia officinalis* in southern France

Emilie Andrieu, Max Debussche, Marta Galloni et John Thompson

En préparation

Exploring the limitations on maternal fertility in perennial plants: a three year experimental study of the protected *Paeonia officinalis* in southern France

Emilie Andrieu, Max Debussche, Marta Galloni* & John Thompson

UMR 5175 - Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, 1919 Route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 5, France (emilie.andrieu@cefe.cnrs.fr)

** Dip. Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna,Via Irnerio 42, Bologna I-40126, Italy.*

Abstract

Female fertility in many perennial plants is significantly lower than maximum potential values. In this study we experimentally manipulate seed production and analyse the potential contribution of pollen limitation, costs of reproduction and plant size to variation in seed output over a three year period in a population of the rare and protected peony, *Paeonia officinalis*, in southern France. Since this species is threatened by forest closure in many sites we also analyse female fertility variation in relation to habitat closure. *P. officinalis* has a partial self-incompatibility system in the study population and only very low ability for autonomous self pollination in the absence of pollinators. Supplementary pollination over three years did not significantly increase seed production above natural levels. Forest closure was associated with a decline in maternal investment in female reproduction (significantly reduced ovule and seed production) but not with pollen limitation, since supplementary pollination had no effect on seed set in the woodland habitat. Comparison of the maternal fertility of plants which were either previously excluded from reproduction or which were hand pollinated to maximise seed set over two consecutive years produced no evidence that seed production is limited by costs associated with prior reproduction. Flowering probability over the three years of study was not related to prior seed production but positively related to plant size. These results provide general insights into the reproductive strategies of perennial plants which may evolve to produce a low but consistent maternal fertility rather than seek to maximise seed output. We comment on the implications of these results for the conservation strategies of populations of protected perennial plants such as our study species which are threatened by contemporary landscape change.

Keywords: Rare species, pollen limitation, costs of reproduction, forest closure, female fertility, self-incompatibility.**Introduction**

In many species of perennial flowering plants, annual seed production is only a fraction of the numbers of flowers or ovules produced by an individual in a given year (Stephenson 1981; Wiens 1984; Sutherland 1986). Several factors may limit seed production: seed predation (Lavergne *et al.* 2005), interaction between resource and pollen limitation (Bierzychudek 1981), allocation to male function (Sutherland & Delph 1984) or to prior reproduction (Obeso 2002), and genetic factors such as inbreeding depression and self-incompatibility (Charlesworth 1989). A survey of the above litterature illustrates that it is rare that one single factor alone limits seed production in perennial plants. For example, they may in fact adjust their seed production to conjointly minimise limitations imposed by pollen and resource availability (Haig & Westoby 1988; Ashman *et al.* 2004).

A key issue here is that maximising annual seed output may cause a cost in terms of future survival and/or reproduction. Since survival is of primary importance in the life-history strategy of perennial organisms, the costs of prior reproduction may be more evident in terms of their effect on future reproduction. Several studies have shown that costs of reproduction can lead to a weaker flowering probability or a reduced subsequent seed production (Ashman 1992; Agren & Willson 1994) or to a lower vegetative growth (Primack & Hall 1990). Nonetheless, in perennial plants, resource conservation in storage organs may alleviate such costs, hence their detection may be tricky and may require several years of experimental manipulation (Ehrlen & Van Groenendael 2001). In addition, in many species, plant size may be more important than seed set *per se* for the expression of any future costs of prior reproduction (Obeso 2002).

Population size and isolation, in interaction with the features of the mating system, can also have dramatic effects on seed set. Pollen limitation for example will depend on the capacity of a plant to produce seeds in the absence of pollinators, i.e. their self-fertility. In self-incompatible species, the amount of compatible pollen arriving on a stigma, and thus seed set, may be limited not just by the quantitiy of pollen receipt but also by a paucity or absence of compatible genotypes in small populations (Charpentier *et al.* 2000) or by changes in the behaviour (less attraction), abundance and/or diversity of pollinators (Steffan-Dewenter

& Tscharntke 1999; Goverde *et al.* 2002; Johnson *et al.* 2004). In self-compatible species, although selfing can provide reproductive assurance (Elle & Carney 2003), it may incur an opportunity cost in terms of reduced future outcrossing (Morgan *et al.* 1997).

The purpose of this study is to examine the causes of sub-maximal fertility in natural populations of a perennial herbaceous peony, *Paeonia officinalis* L. (Paeoniaceae). This protected species is currently threatened by forest spread initiated by land-use changes that have occurred over the last century in Europe (Carmel & Kadmon 1999; Debussche *et al.* 1999; Andrieu *et al.* 2006). In previous work on this species (Andrieu *et al.* 2006) and related *P. mascula* in the eastern Mediterranean (Ne'eman 2003), it has been shown that flowering and recruitment are significantly diminished in situations of forest closure. In the present study we first assessed whether the species is self-compatible, its capacity for spontaneous self-pollination in the absence of pollinators and whether seedlings produced by selfing are subject to inbreeding depression. Our objectives were then to quantify maternal fertility variation and its causes. In this context we asked four questions. First, how variable is natural seed production among years? Second, is seed production pollen-limited? Third, are flowering and maternal fertility dependent on plant size or seed production in previous years? Fourth, is maternal fertility reduced in situations of forest closure, and if so is this due to pollen limitation? This species produces single-stemmed flowers and lack of excess flower production (for male function) and low floral and fruit predation in our study system preclude a role for these factors in the limitation of maternal fertility.

Materials and methods

Study species

Paeonia officinalis occurs in the hills and low mountains of central and southern Europe (Tutin *et al.* 1993), and is protected under French Law. This polycarpic plant has thick tuberised roots and individuals may live several decades. Herbaceous stems appear in early spring, bear a variable number of pennatilobate leaves, and die back in late summer. Reproductive individuals can produce up to 10 flowering stems, 30-70 cm height, but most plants in our study sites have only a single stem (Andrieu et al. ms in review). Flowering occurs from mid-April to mid-May. Each stem bears a single hermaphroditic flower, which

lasts ~ 6 days. Flowers have 5-10 pink-coloured petals and 80-300 stamens, which form a crown around the 1-4 carpels. The large pink flowers have numerous and showy anthers which are attractive to generalist pollinators (mainly large hymenopterans belonging to superfamily Apoideae) that collect pollen. The fruit is a group of 1-4 follicles which dehisce in July. Each dehiscent follicle exposes up to 20 black, 7-9 mm long, ovoid seeds interspersed with unfertilised ovules.

Study sites

The study was carried out in two populations over three years during April to July 2003, 2004 and 2005. The two sites occur near the hamlet of Le Coulet (43° 49' N, 03° 32' E, 500-650 m a.s.l.) and the village of Vissec (43° 54' N, 03° 27' E, 550-600 m a.s.l.), 35 km and 45 km respectively north-west of Montpellier in southern France. The sites are located on limestone, on steep hillsides with stony soils and gravel screes. The climate is classified as per-humid Mediterranean with cold winters (Daget 1977). The vegetation mosaic at the sites is composed of shrubs and small trees (*Buxus sempervirens* L., *Amelanchier ovalis* Medik., *Viburnum lantana* L. and *Prunus mahaleb* L. at the Le Coulet site, *Cornus sanguinea* L. and *Sorbus aria* L. at Vissec) and deciduous oak (*Quercus humilis* Mill.), intermingled with sparse herbaceous cover in rocky clearings. In both sites, peonies have a patchy distribution. At the Le Coulet site, studied plants were mostly scattered across a single large clearing and in adjacent smaller clearings. At Vissec, the population occurs both in a 6-12 m high *Q. humilis* woodland and in an adjacent rocky grassland.

During the study period, vegetation, flowering and fruiting occurred in warmer and drier climatic conditions than average. This was particularly the case in 2003, when the study area experienced a warmer spring than usual with means of the daily maximum temperature for April and May 1 to 2°C above average, and an exceptionally hot summer with means of the daily maximum temperature for June to August 3° C to 6.5° C above the average of historical records (n = 28 yrs; Le Caylar meteorological station, at a similar altitude, 20 km from the study site). In addition, the May-August period was much drier than usual, with a probability of recurrence of once every 8 years (n = 59 yrs; St Maurice-de-Navacelles meteorological station, 4 km distant from the study site). In 2004, spring and summer months

were close to average temperature values, except for June which was 3°C warmer than average. The May-August period was not as dry as in 2003, with a probability of recurrence of once every 4 years. During the 2004 flowering period, pollination may have been limited as a result of many days with rainfall during April (precipitation was three times the average for this month with a period of recurrence of 20 years). In 2005, temperature values for May and July were 1 to 2°C above average and June was 4°C warmer than average, April and August being close to the average. The May-August period was as dry as in 2003.

Experimental procedure

In order to quantify (1) whether the species is self-compatible and any negative effects of selfing in offspring, (2) whether populations suffer from pollen limitation during the three years of the study and whether pollen limitation is exacerbated by habitat closure, and (3) whether prior reproduction may limit seed set in future years, we conducted a range of pollination experiments in the two natural populations.

At Le Coulet in 2003, all flowers on sampled individuals (each individual can have from 1 to 4 flowers) were allocated to one of six treatments. (1) Open-pollination was allowed to occur on "control" (CO) plants (n = 25) whose flowers were un-manipulated. (2) Non-fruiting (NF) individuals (n = 21) were obtained by the removal of anthers and stigmas prior to dehiscence to prevent reproduction. (3) Spontaneous self-pollination (SS) ability was assessed on flowers bagged in nylon-fibre mesh prior to flower opening (n = 25 plants). (4) Hand self-pollination (HS) was performed on flowers bagged in nylon-fibre mesh prior to flower opening by brushing self pollen on stigmas twice during flowering (n = 24 plants); on the second date of pollination, flowers were emasculated. (5) Hand cross-pollination (HC) was performed on bagged flowers which had been emasculated prior to anthesis, by brushing a mix of pollen from ~5 plants in the population not used in the experiment onto the stigma (n = 22 plants) on two different occasions during the life of the flower. (6) Supplementary pollination (PS) was performed as in the previous treatment but on unbagged and un-emasculated flowers (n = 26 plants). All bags were removed from plants once flowers had wilted. The experiment was repeated in 2004, with the same treatments performed on the same plants.All flowerson each plant were included in the experimental treatment. In 2005,

all plants except those in the control treatment were hand-pollinated (as in the supplementary pollination treatment) in order to compare the potential maternal fertility of plants that had been subject to two years of differential allocation to seed production.

The number of seeds and unfertilised ovules was counted in each follicle just before opening. Plant size was estimated from leaf surface area measurements and not from total biomass to avoid the destruction of individuals, both because our study encompassed three successive years and because of the protected status of the study species. In order to verify whether leaf surface area per plant was significantly correlated with leaf biomass, in 2003 we sampled (with the necessary authorization) 30 plants outside the study sample on which we measured the length and the width (to the nearest 0.5 cm) and the dry weight (to the nearest 0.1 mg) of one randomly chosen leaf. Leaf surface area was highly correlated with leaf dry weight ($r_{sp} = 0.84$, $p < 0.001$), hence we used leaf surface area as a surrogate for biomass. For this reason, we measured leaf length and width on the largest leaf of each stem for each individual and calculated leaf surface area by multiplying length by width. Stem size was estimated by multiplying leaf surface area by the number of leaves on the stem and plant size was estimated by summing over stem sizes.

To further examine whether *P. officinalis* shows evidence of a self-incompatibility system and the mechanisms responsible for any self-rejection, we observed the germination and growth of pollen tubes in stigmas subjected to different pollination treatments. At the Le Coulet site, in April 2005, the SS, HS and HC treatments were performed in the field on 55 stigmas on a total of 30 additional plants (n = 17, 18, and 20 stigmas in the three treatments respectively). Two days after pollination, stigmas were collected, brought to the laboratory and fixed in FAA solution (Williams & Knox 1982). Since stigmas of *P. officinalis* are extremely thick, we divided them longitudinally along their suture line and each of the two parts was squashed separately to observe pollen tubes. Pollen tubes were stained with a drop of aniline blue (0.1%), and observed under a fluorescence microscope with a UV filter.

In order to detect inbreeding depression, in July 2003 we harvested seeds (with permission) on self-pollinated (SS and HS, n = 126) and cross-pollinated (HC, n = 290) plants. Each seed was weighed and sown in late August 2003 in a 1.3 L plastic pot (substrate = 1/3 sand + 1/3 local soil + 1/3 compost). No fertilizer was used and pots were weighed

to assure and equal amount of susbstrate in each pot. Pots were placed outside, in a lightly shaded area, and their positions randomised every 2 months. We watered plants during periods of extended drought. In the comparison of selfed and outcrossed offspring we combined the SS and HS treatments in order to provide a sufficient sample size for selfed offspring.

To quantify the effects of canopy closure on reproduction and any pollen limitation at the Vissec site in 2005, 60 individuals were randomly chosen in each of two different habitats - open habitat and deciduous woodland. In each habitat type, 30 plants were allocated to each of two treatments: open pollination (CO) and supplementary pollination (PS), as above.

Data analyses

Analyses of maternal fertility variation were conducted using Statistica 7.1 (StatSoft France 2005) and SAS (SAS Institute Inc. 1999). All parameter estimates are mean ± SE values. Occasional predation of floral or vegetative structures caused our sample sizes for some analyses to differ from the number of plants in the total sample.

Fruit and seed production in the three breeding system treatments (SS, HS, and HC) were compared with Kruskal-Wallis non parametric ANOVA and *post hoc* Dunn multiple comparisons. These analyses were made on four components of reproductive success. First, we calculated overall follicle set, i.e. the number of plants that set at least one follicle relative to the total number of plants. A follicle is a carpel that matured at least one seed; individual flowers can produce 1-3 follicles in our study population. Second, for plants with at least one follicle, we calculated follicle set per carpel (number of follicles / total number of carpels per plant). Third, using all follicles, we calculated the seed / ovule ratio for each plant. Finally, using all flowers in the experiment (i.e. including those with no seeds), we calculated the seed / ovule ratio for each plant. In 2004, some plants did not flower, thus reducing sample sizes. As a consequence, when sample size was too low in a treatment, this treatment was not taken into account in the comparisons and Mann-Whitney U tests were performed. Inter-annual variation in seed / ovule ratios for the three treatments was assessed with a Wilcoxon test for paired data. To assess whether *P. officinalis* is capable of spontaneous self-pollination we calculated the self-fertility index (total seed number on SS divided by that on HC) and to assess self-compatibility we calculated the self-compatibility index (total seed number on HS

divided by that on HC) following Lloyd & Schoen (1992).

Since stigmas of peonies have been divided longitudinally, the growth of each individual pollen tube was difficult to follow. Hence, stigmas were classed into one of three categories: (1) only short pollen tubes (in the close vicinity of the stigmatic surface) were present, (2) at least one pollen tube had elongated in the stigmatic tissue, or (3) the longest pollen tube(s) had reached the base of the stigma. The number of cases in each category were compared with χ^2 tests to assess whether the differences among treatments were significant. Further analyses with 2 x 3 tables were performed to establish which data sets contributed to overall statistical differences.

In the inbreeding depression experiment, date of germination was recorded in 2004, the date of emergence, stem height and leaf surface area (length x width of the leaf) were recorded in 2005. The analysis of any inbreeding depression was performed by comparing the performance of offspring produced by self- and cross-pollination treatments. Mann-Whitney U-tests were used to compare mean seed weight and seedling size (stem height and leaf surface area) per maternal plant, and survival analyses were used to detect differences in germination and emergence date in 2004 and 2005 (PROC LIFETEST, SAS). Spearman rank correlations were used to detect any trade-off between seed number and biomass across maternal plants (since this trade-off could attenuate the differences in seed weight between the two treatments because self-pollinated flowers produce fewer seeds than cross-pollinated flowers).

Pollen limitation was assessed with repeated measures ANOVA and *post hoc* LSD Ficher tests for multiple comparisons were used to compare CO and PS treatments each year. Correlations between seed : ovule ratios among years were quantified with Spearman rank correlations. At the Vissec site in 2005, the impact of habitat type, pollination treatment (CO and SP) and pollination treatment within each habitat on seed / ovule ratio, number of ovules and number of seeds was assessed in successive Mann-Whitney U tests due to non-homogeneity of variances after transformation.

To quantify any effect of seed set in future reproduction plants were allocated to one of three groups: plants that flowered only once (in 2003), plants that flowered twice (in 2003 and either 2004 or 2005), plants that flowered in all three years. Inter-annual variation in plant

size and the relation between plant size and the number of flowering events were studied with a repeated-measures ANOVA after log-transformation of biomass with the following model: log biomass = years + flowering group + (year x flowering group). Wilcoxon signed rank tests were used to test for differences in plant size in 2003 and 2004 for plants that flowered or became vegetative in 2004. Spearman rank correlations were calculated between seed numbers in 2005 and plant size in 2005, and then between seed numbers in 2005/plant size in 2005 and plant size in 2005. To detect any impact of past reproduction on future reproduction and growth, Spearman rank correlations were calculated for the relationships between the cumulated number of seeds produced in 2003 and 2004 and (a) seed/ovule ratio in 2005 and (b) plant size variation between 2003 and 2005. The number of seeds, ovules, seed / ovule ratio and plant size in 2005, plant size variation between 2003 and 2004 and flowering probability were compared in three ways: (a) between the NFand PS treatments, (b) between all plants that were experimentally outcrossed and produced at least one seed in 2003 or 2004 (PS and HC treatments) and all the non-fruiting individuals in 2003 and 2004 (NF treatment plus non-fruiting plants in the SS and HS treatments), and (c) between plants that were selfed and either set seed or were non-fruiting in both 2003 and 2004. Comparison (b) allowed us to increase our sample size and comparison (c) provides an estimate of any demographic or future opportunity cost of selfing on maternal plants. χ^2 tests were used to detect differences in flowering events, Mann-Whitney U tests were used to assess impacts of past reproduction on reproductive and vegetative variables. Repeated measures ANCOVAs were used on plants flowering consecutively the 3 years to detect differences between all plants that were experimentally outcrossed and all the non-fruiting individuals (the only comparison with sample size sufficient) and inter-annual variations (2004-2005) in plant size and ovule number, with the 2003 value as the covariate.

Results

Breeding system

In *Paeonia officinalis*, selfing is possible but low relative to outcrossing, probably as a result of incomplete self-incompatibility (Fig. 1). In 2003, follicle set showed significant variation among treatments: both overall follicle set (KW = 25.52, $p < 0.001$) and follicle set per carpel

(KW = 15.89, $p < 0.001$) showed significant differences among treatments, with significantly lower values after autonomous self-pollination than on outcrossing, and intermediate values on hand self-pollination. There were significant differences among treatments in seed / ovule ratios in follicles (KW = 15.97, $p < 0.001$), and in total seed / ovule ratios (KW = 41.32, $p < 0.001$) due to significantly lower values in the two selfing treatments compared to outcrossing. In 2004, overall follicle set (KW = 25.66, $p < 0.001$), follicle set per carpel (U = 37, $p < 0.05$), seed / ovule ratios (U = 18, $p < 0.01$) and total seed / ovule ratios (KW = 32.31, $p < 0.001$) all showed significant variation among treatments due to significantly lower values in both self-pollination treatments relative to outcrossing.

Total seed / ovule ratios were generally lower in 2004 than in 2003: although a significant decrease was only observed for autonomously self-pollinated plants ($T = 2$, $p < 0.01$, $n = 19$) and not for hand-self-pollinated plants ($T = 54$, $p > 0.1$, $n = 21$) and cross-pollinated plants ($T = 48$, $p > 0.1$, $n = 16$). The self-fertility index (SS/HC) based on total seed number decreased from 0.099 in 2003 to 0.005 in 2004, the self-compatibility index (HS/HC) also decreased from 0.29 in 2003 to 0.14 in 2004.

Self-pollen tubes exhibited irregular growth patterns whereas outcross-pollen tubes were in bundle-like structures, following a direct path to the base of the stigma. Proportions of stigmas with only short pollen tubes were respectively 2/17 after outcrossing, 5/18 after manual selfing, and 15/20 after spontaneous selfing (Fig. 2). The longest pollen tube(s) reached the base of the stigma in 6/17 outcrossed stigmas but only in 2/18 manually selfed and 1/20 spontaneously selfed stigmas. Differences in the number of stigmas in the different classes were thus significant ($\chi^2_4 = 19.95$, $p < 0.001$), primarily due to the highly significant difference between outcrossing and autonomous selfing ($\chi^2_2 = 15.29$, $p < 0.001$), but also due to differences between the two types of selfing ($\chi^2_2 = 8.52$, $p < 0.025$). No significant differences were found between outcrossing and manual selfing ($\chi^2_2 = 15.29$, $p > 0.05$).

No trade off between seed number per maternal plant and seed mean weight per maternal plant was detected after self-pollination ($R_{sp} = -0.169$, $p > 0.1$, n = 23) or cross-pollination ($R_{sp} = 0.120$, $p > 0.1$, n = 23). There was no significant difference between selfing and outcrossing treatments for mean seed weight per maternal plant (Mann Witney $U = 189$, $p > 0.1$), germination date in 2004 (log rank test for differences: $\chi^2_1 = 2.811$, $p > 0.05$, Wilcoxon

test for differences: $\chi^2_1 = 1.997$, $p > 0.1$), seedling emergence in 2005 (log rank test for differences: $\chi^2_1 = 0.238$, $p > 0.1$, Wilcoxon test for differences: $\chi^2_1 = 0.027$, $p > 0.1$), and mean seedling stem height ($U = 176$, $p > 0.1$) and leaf area ($U = 212$, $p > 0.1$) per maternal plant in 2005. Sixteen seedlings (out of a total of 344 seedlings) died during 2004-2005 winter, five in the selfed offspring (4.5 %) and 11 in the outcrossed offspring (4.7 %).

Pollen limitation

Although very different meteorological conditions occurred during the three years of the experiment, including a particularly wet weather during the flowering period of 2004, no evidence of pollen limitation was detected over the three years of supplementary pollination (Fig. 3). Repeated measures ANOVA showed no significant variation in seed / ovule ratios between open-pollination and supplementary pollination treatments ($F_{1,24} = 0.75$, $p > 0.1$), significant variation in seed / ovule ratio between years ($F_{2,48} = 4.28$, $p < 0.05$) but no significant year * treatment interaction ($F_{2,48} = 1.25$, $p > 0.1$). *Post hoc* comparisons showed no significant variation in seed / ovule ratios between the PS and CO treatments each year. At the Vissec site, we found no evidence of pollen limitation in each habitat, but higher maternal investment and fertility in the open habitat (Fig. 4). Ovule number did not differ significantly between plants in the open-pollination and supplementary pollination treatments in either the open ($U = 422$, $p > 0.1$) or the woodland ($U = 374$, $p > 0.1$) habitat, but ovule number of pooled treatments was significantly higher in the open habitat than in the woodland ($U = 1052$, $p = 0.001$). Likewise, seed number did not differ among treatments in either the open ($U = 435$, n = 29; $p > 0.1$) or the woodland ($U = 322$, $n = 27$; $p > 0.1$) habitat, but seed number of pooled treatments was significantly higher in the open habitat ($U = 960$, $p < 0.001$). Seed / ovule ratios did not significantly differ between open-pollinated and supplementary pollination treatments (treatment effect: $F_{1,110} = 0.096$, $p > 0.1$) – a result consistent in both the open and woodland habitats (LSD Fischer $p > 0.05$) - and showed a significant decline in the woodland (habitat effect: $F_{1,110} = 5.41$, $p < 0.05$). The treatment * habitat interaction was not significant ($F_{1,110} = 0.074$, $p > 0.1$).

Plant size, reproduction and the costs of reproduction

The repeatability of flowering over the three years of the study was closely dependent on plant size (Fig. 5). In the repeated measures ANOVA, plant size differed significantly ($F_{2,136} = 15.4$, $p < 0.001$ among the three flowering groups, with plants that flowered in all three years being significantly larger (LSD Fisher test: $p < 0.05$) than those which flowered once or twice. Plant size showed no significant between-year variation in ($F_{2,272} = 2.31$, $p > 0.1$) and no year by flowering group interaction ($F_{4,272} = 1.29$, $p > 0.1$). Plants that flowered in 2003 and became vegetative in 2004 showed no significant variation in size ($n = 40$; $T = 377$, $p > 0.1$) whereas plants that flowered again in 2004 showed a significant increase in size ($n = 101$; $T = 1599$, $p < 0.001$). Large plants produced more seeds than small plants in 2005: as shown by the significant correlation between seed production and plant size ($R_{sp} = 0.272$, $p < 0.01$, $n = 94$) and the absence of a correlation between the number of seeds per flowering stem and plant size ($R_{sp} = 0.013$, $p > 0.1$), increased seed number with size was thus simply due to an increase in the number of flowers. In fact, the relative allocation to seeds was negatively correlated with increasing size ($R_{sp} = -0.493$, $p < 0.001$).

Prior seed set in 2003 and 2004 had no impact on the probability of flowering in 2005. The number of plants in the three flowering groups did not differ between the NF and PS treatments ($\chi^2_2 = 0.74$, $p > 0.1$), between all non-fruiting plants (from the NF, SS and HS treatments) and all fruiting plants that were manually outcrossed (PS and HC treatments) ($\chi^2_2 = 1.88$, $p > 0.1$) or between non-fruiting self-pollinated plants and fruiting self-pollinated plants ($\chi^2_2 = 5.83$, $p > 0.1$). In addition, there was no significant difference in the number of flowering and vegetative plants in the NF and PS treatments in 2004 ($\chi^2_1 = 2.07$, $p > 0.1$) and 2005 ($\chi^2_1 = 0.03$, $p > 0.1$), between all non-fruiting plants and all fruiting plants in 2004 ($\chi^2_1 = 2.22$, $p > 0.1$) and 2005 ($\chi^2_1 = 0.38$, $p > 0.1$) and between non-fruiting self-pollinated plants and fruiting self-pollinated plants in 2004 ($\chi^2_1 = 2.48$, $p > 0.1$) and 2005 ($\chi^2_1 = 3.30$, $p > 0.05$). Plants in the NF and PS treatments in 2003 and 2004 showed no significant difference in plant size ($U = 223.0$, $p > 0.1$), number of ovules ($U = 231.0$, $p > 0.1$), number of seeds ($U = 253.5$, $p > 0.1$) or seed / ovule ratio ($U = 223.0$, $p > 0.1$) in 2005 and no significant difference in amounts of variation in plant size over the three years of study ($U = 235$, $p > 0.1$). Similar results were obtained when all non-fruiting plants were compared with all manually outcrossed plants and when non-fruiting self-pollinated plants were compared with fruiting

self-pollinated plants (data not shown). Prior reproduction had no effect on subsequent reproduction and growth in our three-year study. Combined seed production in 2003 and 2004 was not correlated with seed / ovule ratio in 2005 (R_{sp} = 0.055, $p > 0.1$, n = 95) or with plant size variation between 2003 and 2005 (R_{sp} = 0.038, $p > 0.1$, n = 140).

Discussion

In our study of *Paeonia officinalis*, natural seed / ovule ratios averaged 30-40 % of all ovules and never exceeded ~50 %. Sub-maximal seed / ovule ratios have been observed in other *Paeonia* species (Sanchez-Lafuente *et al.* 1999) and many other perennial plant species in diverse families (Ehrlén 1992; Lawrence 1993; Baker *et al.* 2000; Griffin & Barret 2002)) where a variety of causal factors have been implicated. Our experimental work produced important evidence concerning the possible causes of sub-maximal fertility in this species.

First, experimental modifications of fruit and seed production over two years and the subsequent comparison of fertility on plants which were hand pollinated to maximise flowering and fruiting with that on plants on which we prevented reproduction showed that potential costs of prior reproduction do not contribute to sub-maximal female fertility in this species, at least during the three-year time period of our study. In addition, we found no evidence that prior reproduction has any effect on plant size, growth or flowering. This said, we cannot conclude that the costs of reproduction are totally absent in *P. officinalis*; indeed in perennial plants which stock resources in underground storage organs, detecting any costs of reproduction are notoriously difficult and may require much longer term experiments than our study. For example, increased investment in seed set may cause decreasing investment in resource storage or growth underground and may have effects on the probability of flowering and fruiting several years subsequent to a high reproductive event (Ehrlen & Van Groenendael 2001). Whatever the case, we are able to draw the conclusion that in the period of our investigation, prior reproduction was not a cause of sub-maximal fertility.

A second point of importance here is that plants which differ in size may experience highly contrasting patterns of between-year growth, survival and reproduction, and may differentially experience pollen and resource limitation (Lawrence 1993). Plants which flowered in three consecutive years were larger than plants which flowered in two of the three

years, which in turn were larger that plants flowering only the first year. In our study species, relative investment in seed production declines with plant size feature which may contribute to the capacity of larger plants to flower more frequently. Any potential costs of reproduction may thus be masked by the important role of plant size on the probability of flowering. Indeed, such size-dependent flowering has been observed in numerous other perennial plants (Primack & Hall 1990; Worley & Harder 1996; Pino *et al.* 2002).

A third result of our study is that during three consecutive years of pollen supplementation, we found no evidence that seed set was pollen limited: even with ample outcross pollination, we were unable to raise seed set values much higher than natural values. This adds to growing evidence that long-term female fertility is not necessarily pollen-limited in herbaceous perennials (Ehrlén 1992). The absence of any effect due to pollen limitation needs attention in the light of the floral biology of this species and self-incompatibility system we detected.

The large open bowl-shaped flowers of *Paeonia officinalis* contain many anthers that are not spatially separated from stigmas, and which dehisce and release a huge quantity of pollen while stigmas are fertile. We found that seed / ovule ratios were markedly lower in self-pollinated plants compared to cross-pollinated plants in all three components of seed production in the two years study and that this species produced only very few seeds under spontaneous self-pollination: the self-fertility index ranged between 0.005 and 0.01 in the two years of our study, indicating that in the study population this species sets very few seeds in the absence of pollinators. The fairly long lifetime of flowers (Ashman & Schoen 1994; Ashman & Schoen 1996) which stay open for roughly 6 days may contribute to minimise any need for autonomous selfing. The self-compatibility index varied from 0.14 to 0.28, i.e. in the range that has been associated with a self-incompatibility system in plant species (Baker *et al.* 2000)Lloyd & Schoen 1992). The proportion of very short pollen tubes in spontaneously selfed plants and the observation of a cuticle on the stigmas under the microscope support this claim for a self-incompatibility system. That the self-compatibility values are markedly higher than the auto-fertility values, despite the floral characteristics mentioned above, suggest strong selection for a post-pollination mechanism that limits any deleterious effects associated with interference or inbreeding depression. Again, there is probably some form

of mechanical barrier that is alleviated due to the mechanical action of pollination. Despite the likely outcrossing nature of *P. officinalis*, we did not detect any evidence of inbreeding depression in the progeny of selfed offsprings during seedling establishment in pot conditions. The benevolent conditions of the pot environment may explain this result, although we cannot rule out the possibility of inbreeding depression later in the life cycle (Husband & Schemske 1996). Likewise, we observed no cost of producing seeds by selfing in terms of reduced future seed set on maternal plants

In our study, maternal fertility values under natural and supplementary pollination co-vary over years, indicative of a strong environmental and/or size-dependent variability in reproduction, as found in other herbaceous perennials where individual plants have been examined over several years (Travis 1992; Thompson & Dommée 2000). Based on a strong environmental contribution to average annual seed production in *Amianthium muscaetoxicum*, Travis (1992) suggested that the best surrogate for an individual's fitness (p.277) "may not be how many seeds it has produced over its lifetime (or how high its average annual output has been) but simply how often it has put a minimum number of seeds into the pool". In other words, reliance on a high frequency and repeatability of seed production, rather than maximising seed output, may better equip a species to circumvent the stochastic hazards of the pollination environment that a long-lived perennial plant may experience during the course of its lifetime. In this way, low annual seed production may represent an evolutionary option which favours overall lifetime fitness and thus an adaptive strategy in long-lived species, in which pollen limitation and costs of reproduction become difficult to detect since selection has acted to minimise the effects of over-production of seeds in a given year. The relevance of such a strategy is particularly pertinent for species which experiences the high spatial and temporal dynamics of the mosaic Mediterranean landscape (Lepart & Debussche 1992; Thompson 2005).

Finally, our resuts have implications for conservation strategies for the study species (Andrieu *et al.* 2006) and other herbaceous perennials which in France make up the dominant component of protected plants. A major threat to *P.officinalis* populations is rapid forest spread consecutive to land-use changes in the Mediterranean region of Europe. In recently closed forest habitat one would predict a lower abundance of peony pollinators (mainly

hymenopterans), some of which may avoid shady underforests (Kreyer *et al.* 2004). However, in the present study we found no evidence of pollen limitation in woodland. This may be because flowering occurs prior to deciduous oak leaf emergence in the study site. The reduced ovule and seed numbers in this habitat are thus due to resource limitation other than pollen as proposed elsewhere (Barkham 1980; Valverde & Silvertown 1995). Habitat closure also causes reduced flowering and recruitment of seedlings in some populations of the study species (Andrieu et al. 2006), and may thus make a strong contribution to reduced population growth (Silvertown *et al.* 1993). Management strategies should also consider the finding that plants with high biomass produce more seeds in a given year and over a period of several years flower more often and thus produce more seeds more frequently than small plants. Thus, favoring factors leading to an increase of biomass, by reducing woody species colonisation, could enhance reproductive success. We are currently monitoring individuals in a long term demographic survey in order to detect which components of the plant life cycle are sensitive to forest closure.

Acknowledgements

This work was funded in part by the European programme "Mediterranean Mountain Ecosystems in a Changing World" and in the programme of the Long-Term Research Area "Mediterranean Backcountry", both funded by the C.N.R.S. EA was funded by a Ph.D grant from the French ministry of education and research. MG was funded by a Marco Polo research grant from AlmaUE, University of Bologna. We are grateful to Adeline André, Laure Andrieu, Audrey Coreau and Anabelle Dossantos who participated to field work. Thanks also to Mr and Mrs Buresi and inhabitants of Vissec for access to their private land. All experiments in this study complied with the current law of France.

References

Agren, J. & Willson, M.F. (1994) Cost of seed production in the perennial herbs *Geranium maculatum* and *G. sylvaticum* - an experimental field-study. *Oikos*, **70**, 35-42.

Andrieu, E., Debussche, M., & Thompson, J.D. (2006) The impact of forest spread on a

marginal population of a protected peony (*Paeonia officinalis* L.): the importance of conserving the habitat mosaic. *Biodiversity and Conservation*, **(in press)**.
Ashman, T.-L. & Schoen, D.J. (1994) How long should flowers live? *Nature*, **371**, 788-791.
Ashman, T.-L. & Schoen, D.J. (1996). Floral longevity: fitness consequences and resource costs. In *Floral Biology. Studies on floral evolution in animal-pollinated plants* (eds D.G. Lloyd & S.C.H. Barett), pp. 112-139. Chapman Hall, New York.
Ashman, T.L. (1992) Indirect costs of seed production within and between seasons in a gynodioecious species. *Oecologia*, **92**, 266-272.
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.
Baker, A.M., Barrett, S.C.H., & Thompson, J.D. (2000) Variation of pollen limitation in the early flowering Mediterranean geophyte *Narcissus assoanus* (Amaryllidaceae). *Oecologia*, **124**, 529-535.
Barkham, J.P. (1980) Population-dynamics of the Wild Daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*).1. Clonal growth, seed reproduction, mortality and the effects of density. *Journal of Ecology*, **68**, 607-633.
Bierzychudek, P. (1981) Pollinator limitation of plant reproductive effort. *American Naturalist*, **117**, 838-840.
Carmel, Y. & Kadmon, R. (1999) Effects of grazing and topography on long-term vegetation changes in a Mediterranean ecosystem in Israel. *Plant Ecology*, **145**, 243-254.
Charlesworth, D. (1989) Evolution of low female fertility in plants: pollen limitation, ressource allocation and genetic load. *Trends in Ecology and Evolution*, **4**, 289-292.
Charpentier, A., Grillas, P., & Thompson, J.D. (2000) The effects of population size limitation on fecundity in mosaic populations of the clonal macrophyte *Scirpus maritimus*. *American Journal of Botany*, **87**, 502-507.
Daget, P. (1977) Mediterranean bioclimate - General characteristics and modes of definition. *Vegetatio*, **34**, 1-20.
Debussche, M., Lepart, J., & Dervieux, A. (1999) Mediterranean landscape change: evidence from old postcards. *Global Ecology and Biogeography*, **8**, 3-15.
Ehrlén, J. (1992) Proximate limits to seed production in a herbaceous perennial legume, *Lathyrus vernus*. *Ecology*, **73**, 1820-1831.
Ehrlen, J. & Van Groenendael, J. (2001) Storage and the delayed costs of reproduction in the understorey perennial *Lathyrus vernus*. *Journal of Ecology*, **89**, 237-246.
Elle, E. & Carney, R. (2003) Reproductive assurance varies with flower size in *Collinsia parviflora* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, **90**, 888-896.
Goverde, M., Schweizer, K., Baur, B., & Erhardt, A. (2002) Small-scale fragmentation effects on pollinator behaviour: experimental evidence from the bumblebee Bombus veteranus on calcareous grasslands. *Biological Conservation*, **104**, 293-299.
Griffin, S.R. & Barret, S.C.H. (2002) Factors affecting low seed:ovule ratios in a spring woodland herb, *Trillium grandiflorum* (Melantiaceae). *International Journal of Plant Science*, **163**, 581-590.
Haig, D. & Westoby, M. (1988) On limits to seed production. *American Naturalist*, **131**, 757-759.
Husband, B.C. & Schemske, D.W. (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, **50**, 54-70.
Johnson, S.D., Collin, C.L., Wissman, H.J., Halvarsson, E., & Agren, J. (2004) Factors contributing to variation in seed production among remnant populations of the endangered daisy *Gerbera aurantiaca*. *Biotropica*, **36**, 148-155.

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.

Lavergne, S., Debussche, M., & Thompson, J.D. (2005) Limitations on reproductive success in endemic *Aquilegia viscosa* (Ranunculaceae) relative to its widespread congener *Aquilegia vulgaris*: the interplay of herbivory and pollination. *Oecologia*, **142**, 212-220.

Lawrence, W.S. (1993) Resource and pollen limitation: plant size-dependent reproductive patterns in *Physalis longifolia*. *American Naturalist*, **141**, 296-313.

Lepart, J. & Debussche, M. (1992). Human impact on landscape patterning: Mediterranean examples. In *Landscape boundaries, consequences for biotic diversity and ecological flows* (eds J.A. Hansen & F. di Castri), pp. 76-106. Springer, New York.

Lloyd, D. G.; Schoen, D. J., **1992** Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional aspects. *International Journal of Plant Sciences***,** 153, 358-369.

Morgan, M.T., Schoen, D.J., & Bataillon, T.M. (1997) The evolution of self-fertilization in perennials. *American Naturalist*, **150**, 618-638.

Ne'eman, G. (2003) To be or not to be - the effect of nature conservation management on flowering of Paeonia mascula (L.) Miller in Israel. *Biological Conservation*, **109**, 103-109.

Obeso, J.R. (2002) The costs of reproduction in plants. *New Phytologist*, **155**, 321-348.

Pino, J., Sans, F.X., & Masalles, R.M. (2002) Size-dependent reproductive pattern and short-term reproductive cost in *Rumex obtusifolius* L. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, **23**, 321-328.

Primack, R.B. & Hall, P. (1990) Costs of reproduction in the Pink Ladys-Slipper Orchid - a 4-year experimental-study. *American Naturalist*, **136**, 638-656.

Sanchez-Lafuente, A.M., Rey, P.J., Alcantara, J.M., & Valera, F. (1999) Breeding system and the role of floral visitors in seed production of a "few-flowered" perennial herb, Paeonia broteroi Boiss.& Reut. (Paeoniaceae). *Ecoscience*, **6**, 163-172.

SAS Institute Inc., ed. (1999) *SAS/STAT user's guide*, Cary.

Silvertown, J., Franco, M., Pisanty, I., & Mendoza, A. (1993) Comparative plant demography-relative importance of life-cycle components to the finite rate of increase in woody and herbaceous perennials. *Journal of Ecology*, **81**, 465-476.

StatSoft France (2005) Statistica.

Steffan-Dewenter, I. & Tscharntke, T. (1999) Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set. *Oecologia*, **121**, 432-440.

Stephenson, A.G. (1981) Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **12**, 253-279.

Sutherland, S. (1986) Patterns of fruit set: what controls fruit-flower ratios in plants. *Evolution*, **40**, 117-128.

Sutherland, S. & Delph, L.F. (1984) On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit set. *Ecology*, **65**, 1093-1104.

Thompson, J.D. (2005) *Plant evolution in the Mediterranean* Oxford University Press, Oxford, U.K.

Thompson, J.D. & Dommée, B. (2000) Morph specific stigma height variation in distylous *Jasminum fruticans*. *New Phytologist*, **148**, 303-314.

Travis, J. (1992). Components of reproductive success in the herbaceous perennial *Amianthum muscaetoxicum.* In *Ecology and Evolution of Plant Reproduction* (eds R. Wyatt), pp. 255-280. Chapman and Hall, New York.

Tutin, T.G., Burges, N.A., Chater, A.O., Edmondson, J.R., Heywood, V.H., Moore, D.M.,

Valentine, D.H., Walters, S.M., & Webb, D.A. (1993) *Flora Europaea*, second edn. Cambridge University Press, Cambridge.
Valverde, T. & Silvertown, J. (1995) Spatial variation in the seed ecology of a woodland herb (*Primula vulgaris*) in relation to light environment. *Functional Ecology*, **9**, 942-950.
Wiens, D. (1984) Ovule survivorship, brood size, life history, breeding systems, and reproductive success in plants. *Oecologia*, **64**, 47-53.
Williams, E.G. & Knox, R.B. (1982) Quantitative analysis of pollen-tube growth in *Lycopersicon peruvianum*. *Journal of Palynology*, **18**, 65-74.
Worley, A.C. & Harder, L.D. (1996) Size-dependent resource allocation and costs of reproduction in *Pinguicula vulgaris* (Lentibulariaceae). *Journal of Ecology*, **84**, 195-206.
Zimmerman, M.; Pyke, G. H., **1988** Reproduction in *Polemonium*: assesing the factors limiting seed set. *American Naturalist***,** 131, 723-738.

Figure legends

Figure 1. Mean (± SE) values of overall fruit set (a), follicle set per carpel (b), seed / ovule ratio in follicles (c) and total seed / ovule ratio (d) following autonomous self-pollination (SS), manual self-pollination (HS) and outcross-pollination (HC) in 2003 (open squares) and 2004 (closed squares). Treatments with different code letters are significantly different from one another after Dunn's *post-hoc* means comparisons.

Figure 2. Comparison of the proportion of stigmas which had (a) only short pollen tubes present (black portion of bars), (b) at least one pollen tube elongated in the stigmatic tissue (grey bars), and (c) at least one pollen tube that reached the base of the stigma (open bars) following autonomous selfing (SS) manual selfing (HS) and manual outcrossing (HC) in 2005 at the Le Coulet site.

Figure 3. Mean (± SE) seed / ovule ratios on open (open symbols) and supplementary (closed symbols) pollinated plants in 2003, 2004 and 2005 at the Le Coulet site.

Figure 4. Mean (± SE) values of (a) number of ovules, (b) number of seeds and (c) seed / ovule ratios on open (open symbols) and supplementary (closed symbols) pollinated plants in open habitat and woodland at the Vissec site in 2005.

Figure 5. Mean (± SE) plant size in each flowering group over the three years of the study (solid line: plants which flowered only in 2003 i.e. one flowering event, dashed line: plants with two flowering events, dotted line: plants with three flowering events).

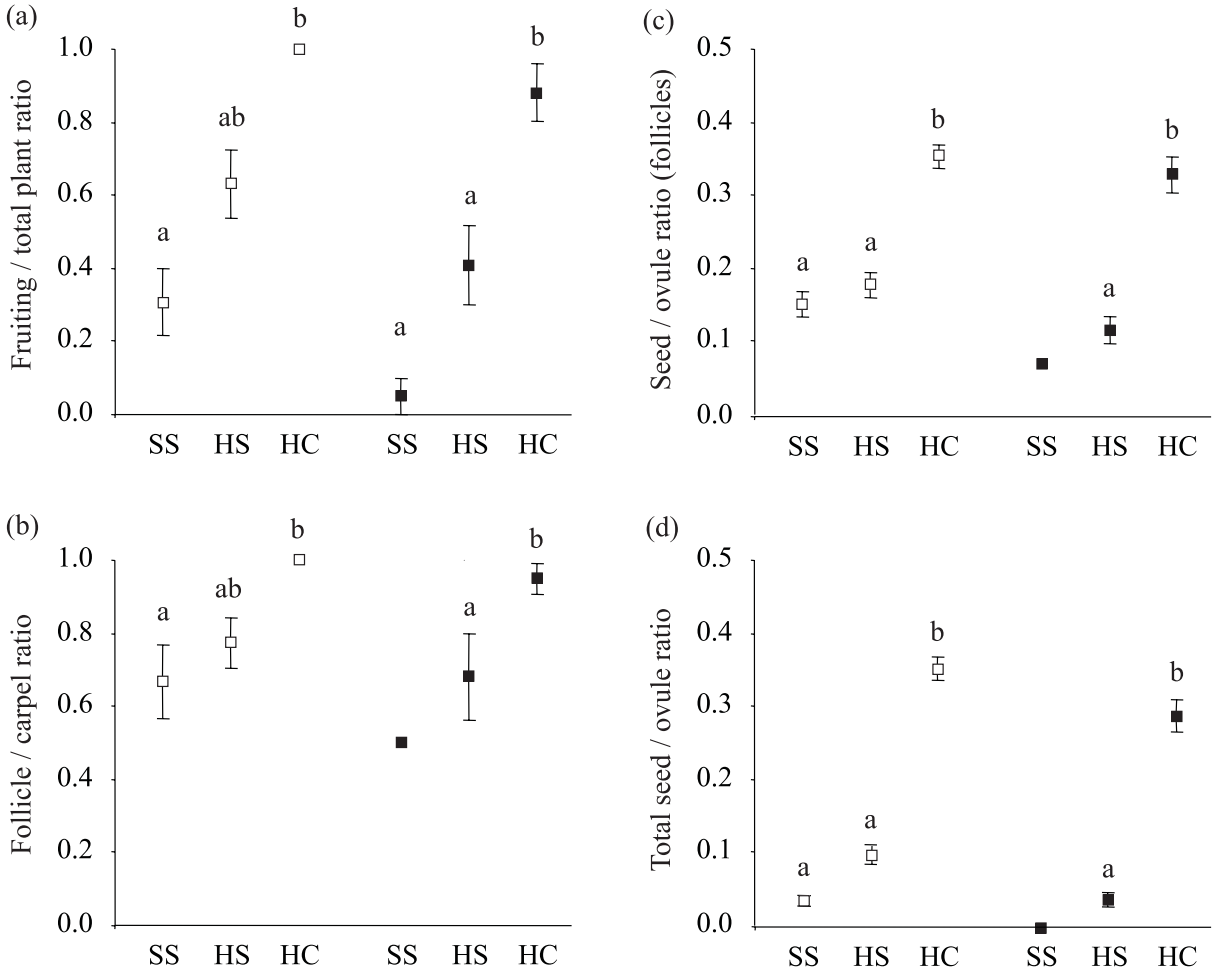


Figure 1

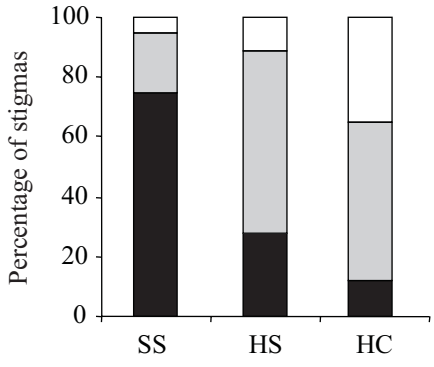


Figure 2

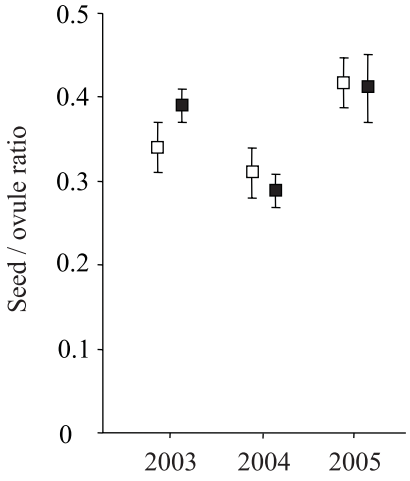


Figure 3

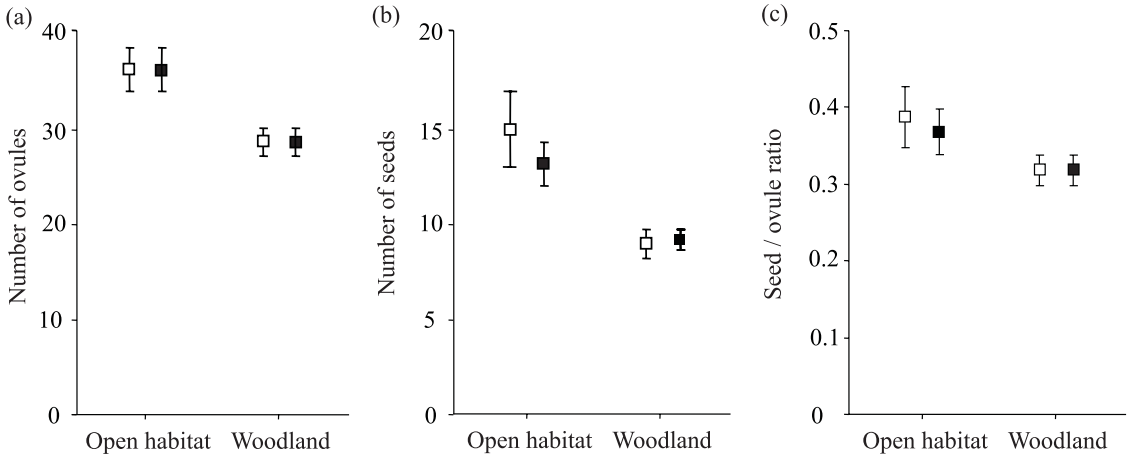


Figure 4

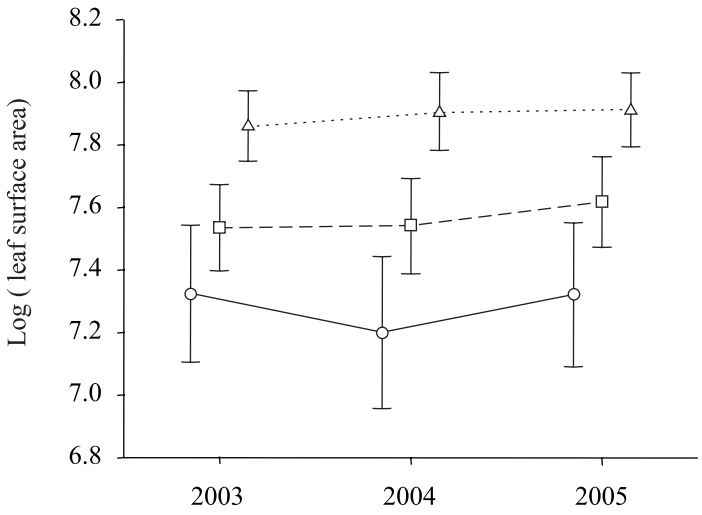


Figure 5

Annexe 2.4

Diaspore removal and potential dispersers of the rare and protected *Paeonia officinalis* L. in an heterogeneous landscape

Emilie Andrieu et Max Debussche

En préparation

Diaspore removal and potential dispersers of the rare and protected *Paeonia officinalis* L. in an heterogeneous landscape

E. ANDRIEU*, M. DEBUSSCHE

UMR 5175 Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS,

1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

* Corresponding author.

E-mail: emilie.andrieu@cefe.cnrs.fr, max.debussche@cefe.cnrs.fr

Running title: Diaspore removal and heterogeneous landscape.

Abstract

Knowledge of seed dispersal ability in relation to habitat is crucial for our understanding of plant-population functioning. The aims of this paper are to infer from diaspore removal (i) the identity of the potential animal dispersers of the protected *Paeonia officinalis*, and (ii) the dispersal ability of this species occuring in open habitats threatened by forest spread Two experiments were performed in open habitat and woodland to quantify (i) above ground and on the ground diaspore removal in a cafeteria experiment that selectively excluded birds, small rodents and/or ants, and (ii) diaspore fall on unbagged vs. bagged infructescences. Ants did not contribute to dispersal. The majority of diaspores on follicles fell to the ground, with an impact of birds and/or small rodents low in woodland and negligible in open habitat. Removal rate on the ground was twice higher in woodland than in open habitat. Small rodents, unexpectedly appear to be the major potential dispersers. We suggest that contribution of birds was low, but it remained unquantified. The diaspores show several morphological traits which fit to ornithochory syndrome but other traits, as a very low investment in pulp, remind of mimetic diaspores deceiving bird dispersers. The highest removal rates occurred in the habitat where the lowest amount of available seeds (woodland) and vice versa, suggesting that woodland edge could be crucial for the population dynamics of *P. officinalis* because it combines disperser activity and seed availibility. Our results suggest that long-distance dispersal is very rare, weakening a possible escape in space of populations subject to forest spread.

Key words: diaspore removal, forest spread, landscape heterogeneity, mimetic diaspore, ornithochory syndrome, *Paeonia officinalis*, rare plant species, rodents, seed dispersal.

1. Introduction

The changes in structure, composition and dynamics of habitats in the landscape, greatly accelerated in recent years by land use changes and climatic modifications, can jeopardize plant species persistence both in a particular site, in the frequent case of the absence of a seed bank (Baskin and Baskin, 1998), and on a regional scale, when dispersal events are constrained by low seed number and short distance dispersal (Johst et al., 2002). These constraints are particularly important where habitats vary dramatically in space or time. Such variation may be particularly significant for rare plant species with low fertility (Lavergne et al., 2004) and reduced dispersal abilities (Gaston and Kunin, 1997).

Land use changes are the main cause of biodiversity erosion throughout the world (Sala et al., 2000). Their impacts on the habitat mosaic considerably differ according to site and socio-economic features. In many coastal, peri-urban and agricultural areas, habitat loss and fragmentation are occurring at ever-increasing rates. In other areas, such as mountains (Delcros, 1994; André, 1998) and the Mediterranean backcountry (Lepart and Debussche, 1992; Debussche et al., 1999) of Europe the extensive expansion of forests and shrublands has caused a dramatic decline of previously open habitats due to rural exodus and land abandonment. In these regions, rare species of open habitat are particularly threatened (e.g. (Médail et al., 2002; Ne'eman, 2003). Changes in the habitat mosaïc can also affect both the distance and direction of dispersal (Russell and Schupp, 1998; Alcantara et al., 2000), and post-dispersal processes (Koricheva et al., 1998; Prieur-Richard et al., 2002). Hence, the functioning and the persistence of individual populations and their dynamics at the scale of the metapopulation is affected (Primack and Miao, 1992; Johst et al., 2002). Knowledge of dispersal ability in relation to spatial and temporal habitat variability is thus crucial to the understanding of the functionning of plant populations in the landscape.

Studies on seed dispersal generally follow one of two main approaches (Wang and Smith, 2002). First, one can examine the consequences of seed dispersal, e.g. seedling spatial distribution (Colas et al., 1997), demography (Harms et al., 2000) or population genetic structure (Petit et al., 1997; Cain et al., 2000; Fréville et al., 2001). However, dispersal and post dispersal processes can then be difficult to disentangle (Nathan and Muller-Landau, 2000). Second, one can follow the fate of the seeds from their site of production to their deposition site, e.g. with seed

traps (Weiblen and Thomson, 1995; Harms et al., 2000), by following marked seed displacement (Kalisz et al., 1999; Wang and Smith, 2002), by diaspore removal experimentations (Kelrick et al., 1986; Weiblen and Thomson, 1995; Hulme, 1997) or by observing seed disperser behaviour (Herrera and Jordano, 1981; Vellend et al., 2003). In this way, the number of seeds produced and dispersed, the distribution of dispersal distances and the dispersal direction towards a given habitat can be estimated in relation to the behaviour of the dispersal agents (Hulme and Kollmann, 2005). Diaspore removal experimentations are appropriate when the dispersed seed number is low, because the source produces few seeds (e.g. rare species with low fertility and low density) and / or because dispersal events are rare (non-attractive diaspores, few dispersal agents). Such experiments do not allow to elucidate if the seeds have been predated or dispersed, and thus the relative impact of seed dispersers cannot be directly distinguished from that of seed predators. However, these experiments make it possible to determine the assemblage of potential dispersers and, thanks to their behaviour, to infer dispersal patterns.

The main objectives of this paper are to infer from diaspore removal (i) the identity of the potential animal dispersers of the rare and protected *Paeonia officinalis* L., and (ii) the dispersal ability of this species that occurs in open habitats threatened by forest and shrubland spread in two contiguous contrasting habitats (open *vs*. woodland). The dispersal features in the genus *Paeonia* still remain undocumented even though some species relative to *P. officinalis* display an ornithochory syndrome (Pijl, 1972; Herrera, 1989) suggesting that frugivorous birds could be the main diaspore removers and seed dispersers of these plants. More precisely, we address the following questions: i) what is the relative role of ants, small rodents and birds as diaspore removers in open habitat and in woodland ?, ii) which animal groups constitute the potential disperser assemblage and how does they shape the spatial patterns of seed dispersal ?, iii) why is there a discrepancy between the syndrome of diaspore display and the potential disperser assemblage ?

2. Materials and Methods

2.1 Study species

Paeonia officinalis L. occurs in the hills and low mountains of central and southern Europe (Tutin et al., 1993) and is protected under French Law. This polycarpic herbaceous

geophyte has thick tuberised roots and may live several decades. The pinnatilobate leaves appear in early spring and die back in late summer. Reproductive individuals produce 1-10 flowering stems, 30-70 cm height, each with a single pink-coloured flower opening out from mid April to mid May. Flowers have 5-10 petals and 80-300 stamens which form a crown around the 1-4 carpels. In summer, the dehiscent follicles expose up to 20 black, 7-9 mm long ovoid diaspores with a thin fleshy external tegument, anatomically a false aril, which contrast with the dull pink colour of the follicle interior. The diaspores show several traits which fit well to ornithochory syndrome (Pijl, 1972; Herrera, 1989), namely: a) a fleshy and edible external tegument, b) closed green thick-walled follicles which provide an outer protection against premature consumption by birds, c) a hard inner coat to protect the consumed seed, d) conspicuous exposure when the follicle dehisces, e) permanent attachment and display, f) signalling colour, black being one of the two commonest colours in bird-dispersed plants in the Mediterranean region (Herrera, 1987; Debussche, 1988) and elsewhere (Willson and Thompson, 1982) and this colour is more conspicious for birds (Willson et al., 1990; Schmidt et al., 2004).

2.2 Study sites

Field experiments took place at two sites in the French Mediterranean backcountry; Vissec (43°54' N, 3°27' E, 550 m a.s.l.) and Saint-Florent-sur-Auzonnet (44°14' N, 4°07' E, 450 m a.s.l.), 45 km north-west and 70 km north of Montpellier respectively. Both sites are located on limestone, on north to north-west facing steep hillsides with stony soils and gravel scree slopes. At both sites, the climate is classified as humid Mediterranean with cold winters (Daget, 1977). Each site is composed of two neighbouring and contrasting habitats: a dense oak woodland and an open grassy shrubland. At Vissec, the 6-12 m-high deciduous downy oak (*Quercus humilis* Mill.) woodland contains an undergrowth dominated by stands of *Cornus sanguinea* L. and with a very sparse herbaceous cover. The open habitat is a clear dry grassland with scattered clumps of tall shrubs, mostly *Buxus sempervirens* L., *Amelanchier ovalis* Medik. and *Crataegus monogyna* Jacq. At Saint-Florent-sur-Auzonnet, the 6-9 m-high evergreen holm oak (*Quercus ilex* L.) woodland has more open undergrowth dominated by *Ruscus aculeatus* L. and a very sparse herbaceous and shrub cover. The open habitat is a mosaic of dry grassland intermingled with 1-2 m-high holm oaks and shrubs (e.g. *Amelanchier ovalis* and *Prunus*

mahaleb L.).

2.3 Diaspore removal

We have distinguished two types of diaspore removal by animals: removal of diaspores from the follicles and removal of diaspores once they have fallen to the ground. A first experiment was designed at Vissec to estimate the variation with habitat of the proportion of ripe diaspores simply falling from the follicles to the ground and of ripe diaspores being removed by animals (both dispersers and predators) from the follicles. Because of the low numbers of flowering plants in the population at Saint-Florent-sur-Auzonnet we did not do this experiment at this site. Sixty (open habitat) and 66 (woodland) flowering stems (1 per plant) were randomly selected over an area of 1-2 ha in each habitat. Flowering stems were randomly allocated to two treatments. The follicles of half of the flowering stems were enclosed within textile bags in order to prevent any removal of diaspores (bagged treatment) and the remaining flowering stems were left open to animals (unbagged treatment). The stems were bagged one month before dehiscence in order to accustom animals to bags. Weekly, from 19 June 2004 to 31 August 2004, then each 2 weeks to 26 October 2004 and finally monthly to 25 January 2005, we checked out the date of follicle dehiscence, the difference between the number of disappeared diaspores in unbagged treatment and fallen diaspores in bagged treatment, which provided an estimation of diaspore removal by dispersers and predators, and the height above ground of unbagged infructescences .

A second experiment was designed to identify which animal groups remove *Paeonia* diaspores (and afterwards can act as dispersers and/or predators) and estimate their relative importance in the removal. This experiment was performed in both habitats in both sites. Treatment features were based on the assumption that animals which remove the diaspores could be birds, small rodents and/or ants. We took into account (1) small rodents because they can climb up *P. officinalis* stems and eat unripe diaspores, and because we have observed remains of *P. officinalis* ripe seeds in a refuse pile at the opening of a rodent hole, (2) ants (e.g. *Messor sp*.) because they also climb up stems and can move *P. officinalis* diaspores when they are placed on their trails, and (3) birds because of the ornithochory syndrome displayed by this species. The experiment comprised eight treatments with six replicates in each habitat. Each treatment was designed to prevent one, two or all of the above three groups of animals from

removing ripe diaspores (see also: (Turnbull and Culver, 1983; Kelrick et al., 1986; Kollmann et al., 1998). Replicates were located among *P. officinalis* plants and 20-50 m distant from each other. Treatments were randomly assigned to positions 2 m apart along 2 parallel lines separated by 2 m. In each of the eight treatments, five ripe diaspores were placed on a 5 cm-diameter wood box with a 1.5 cm-high and 1-2 cm-wide rim; four holes (2.5 mm diameter) allowed rainwater to drain off. Half of the treatments offered ripe diaspores above ground, at a height close to the height of diaspores in follicles. The other half offered ripe diaspores at ground level. The 480 diaspores used at each site had been collected at the same site. We offered ripe diaspores following the seed dish technique, widely used in study concerning seed removal by invertebrates, rodents and birds (see e.g. Kollman et al. 1998, Castro et al. 1999, Folgarait and Sala 2002 and Kelrick et al. 1986 for assumptions of this technique) In order to accustom animals to the experiment, devices were all installed one month before diaspores were placed.

The four treatments offering diaspores above ground were designed to prevent small rodents and ants (T1), birds (T2), birds and small rodents (T3) and birds, small rodents and ants (T4 = control) to remove the diaspores. In each case, the wood box receiving the diaspores was nailed on a stake and placed 40 cm above ground level. The protocol associated with each treatment was as follows: T1, the stake was coated with Pelton® glue and an upside down plastic cup was placed along its length; T2, the wood box was covered with a 30 x 15 x 10 cm tunnel of 1cm wire mesh clipped on its sides and a piece of wire mesh was loosely twisted along the stake; T3, the wood box was entirely enclosed in a 10 x 7 x 7 cm cage of 1 cm wire mesh clipped on its sides; T4, methods of both T1 and T3 were combinated.

The four treatments offering diaspores on the ground were designed in order to allow free access to every animal (T5), to prevent birds (T6), birds and small rodents (T7) or birds, small rodents and ants (T8 = control) from removing diaspores. In each case, the wood box receiving the diaspores was nailed to the ground and maintained horizontal with tent pegs which also served to maintain wire mesh applied on the ground. The protocol associated with each treatment was as follows: T5, the wood box was simply placed on the ground; T6, the wood box was covered with a 30 x 15 x 10 cm tunnel of 1 cm wire mesh; T7, the wood box was entirely enclosed in a 10 x 7 x 7 cm cage of 1 cm wire mesh; T8, same device as T7 with the rim of the wood box coated with Pelton® glue.

None of the potential diaspore removers could access the control treatments. Any loss of diaspores from these controls being due to the intense rainfall events which occurred several times during the study (an unavoidable consequence of the climate during the seed dispersal period). Diaspore removal was checked eight times (after 2, 4, 6, 8, 14, 21, 35 and 50 days) from August through September 2004.

2.4 Fleshy diaspores

To be consistent with the functional terminology adopted by studies on fleshy-fruited plants we will hereafter call "pulp" the external fleshy tegument of the diaspore and "seed" its internal hard part. In order to test whether *P. officinalis* diaspores share morphological and chemical traits with those of fleshy-fruited plants occurring in the same region and which ripen in the same season, i.e. in summer (n = 24, see Debussche et al., 1987), we estimated four fruit traits potentially important for the nutritional reward of dispersers (Herrera, 1982; Debussche et al., 1987) and to explain evolutionary trends in fruits (Jordano, 1995): diaspore volume, pulp/diaspore volume ratio, and the lipid and carbohydrate contents of pulp. The two largest (L and l) dimensions of 30 fresh diaspores collected on six different plants were measured before and after pulp had been removed to compute diaspore volume and seed volume (volume = $2/3\ \pi$ L l), and then pulp/diaspore ratio (ratio = (diaspore volume – seed volume) $(\text{diaspore volume})^{-1}$).

The pulp used to analyse lipid and carbohydrate contents was obtained from 130 fresh diaspores collected on 20 different plants. Carbohydrate content was determined by colorimetry (Dubois et al., 1956) after extraction of 10 mg of freeze-dried pulp with HCl 0.1 N (pH= 1.2) by shaking at 40°C, in lieu of the 1-2 g of freeze-dried pulp used in Debussche et al. (1987) requiring more pulp than available. Lipid content was determined in accordance with (Bligh and Dyer, 1959): 50 mg of freeze-dried pulp was centrifugated (10 mn at 4500 rpm) with 2 mL methanol, 2 mL chloroform and 2 mL deionized water, the chloroform extract was evaporated and the total residue was weighted after extraction, in lieu of the method previously used, requiring more pulp than available. The consistency of the results obtained in 1987 and 2004 was tested by Spearman rank correlations, on a sample of 12 plant species covering large ranges of lipid and carbohydrate contents. The values of lipid and carbohydrate content were highly correlated among methods (lipid: $r = 0.85$, $p < 0.001$; carbohydrate: $r = 0.86$, $p < 0.001$), thus the lipid

and carbohydrate contents of the *P. officinalis* pulp were compared to the contents measured in 1987 for summer fruiting fleshy-fruited species after a correction based on linear regressions ($lipids_{1987} = -1.21 + 1.02\ lipids_{2004;}$ $carbohydrates_{1987} = -0.37 + 0.78\ carbohydrates_{2004}$),.

Because the morphology and display of the diaspores, and consequently their potential attractiveness for dispersers, varies between different species of the genus *Paeonia*, we compared the values of the four studied traits obtained for *P. officinalis* with the values obtained with the same methods for *P. cambessedesii* Willk., a Balearic and Corsican species which belongs to a different phylogenetic group (Sang et al., 1997) and presents a marked ornithochory syndrome. In addition, for both species, we measured the two largest dimensions (L and l) of 30 fresh unfertilised ovules interspersed between diaspores, collected on six plants, to compute ovule surface (surface = 1/4 π L l) which may enhance diaspore conspicuousness by colour contrast

.

2.5 Data analysis

Survival analysis

Survival analysis is used when the response variable of interest is a time period until an event occurs. This type of analysis makes it possible to account for events that did not occur, because of the end of an experiment or the loss of an individual (i.e. right censored data). We used the Cox proportional hazard (PH) model because of its robustness and because it allows for the inclusion of covariates (Kleinbaum, 1996). The hazard function in the Cox PH model is the product of a time-dependent baseline hazard function $h_o(t)$ and a time-independent exponential expression :

$$h(t,X) = h_0(t) \times e^{\sum_{i=1}^{p} \beta_i X_i}$$

where X_i are p independent covariates and β_i are the regression coefficients to be estimated. Comparisons between regression coefficients were performed using the Wald statistics in PROC PHREG in SAS (SAS Institute Inc., 1999). The proportional hazard assumption of Cox PH model is evaluated both by a graphical approach (log-log plots of observed vs. expected survival curves) and with time-dependent covariates (Kleinbaum, 1996). If some covariates do not satisfy this assumption, they are not included in the model but controlled by stratification

using Stratified Cox (SC) model. The assumption of no interaction in the stratification model was assessed by comparing the model with a model including interactions between the stratified covariates and the covariates included in the model (Kleinbaum, 1996). When a categorical covariate has more than two levels, we used dummy covariates (1 per level) and choose one of them as the reference group (its coefficient is then fixed to 0).

Diaspore removal on the plant

The similarity of stem height and diaspore number between bagged and unbagged groups at the beginning of the experiment was verified in each habitat by Kruskall-Wallis non-parametric analysis of variance followed by Dunn's test for multiple comparisons. Variation in the phenology of follicle dehiscence among groups was compared using a Cox PH model, the event being the latest date of dehiscence of a follicle on a stem. Changes in the height above ground of infructescences from the date of dehiscence of carpels to the date of disappearance of the last diaspore (or the date of the end of the experiment if the last diaspore did not fall) was analysed with Wilcoxon's signed ranks test. The time length of diaspore display (date of the disappearance of the last diaspore minus date of follicle dehiscence) was analysed with a Cox PH model, the event being the date of disappearance of the last diaspore of a stem.

Cafeteria experiment

The Cox PH model was again used to analyse the cafeteria experiment. The independence of the removal events of the diaspores was verified by using a χ^2 test to compare: (1) the observed distribution of the number of removed diaspores (0 to 5) per box at the first date of monitoring (when the initial number of diaspores was equal to 5 in all the boxes), (2) the theoretical distribution of the number of removed diaspores per box under the hypothesis of independence of removal events, i.e. a binomial law B (5, r) were r is the defined probability of being removed for a diaspore. This assumption can be accepted, the observed distribution was not significatively different from a binomial distribution ($X^2_2 = 0.847$, $p = 0.654$).

Diaspore removal above ground and on the ground were analysed separately. The covariates were site (n = 2), habitat (n = 2), treatment (for convenience, we called treatment the set of dummy covariates i.e. T1, T2, T3, T4 for above ground removal and T5, T6, T7, T8

for on the ground removal and their second order interactions. All 18 potential models were performed for each removal type, including the null model (i.e. the model without covariates). The proportional hazard assumption was satisfied in the models for removal on the ground but not in the models for removal above ground. Hence, models for removal above ground were stratified by the covariate habitat and stratification assumption was verified, which leads to five models. Model selection was used for ordering the models (Johnson and Omland, 2004) thanks to the Bayesian Information Criterion (BIC), which is structurally similar to the Akaike Information Criterion (AIC) but tends to favour simple models as sample size increases (Burnham and Anderson, 1998). The model with the lowest BIC is the model which best fits the data, with the least number of parameters.

3. Results

3.1. Diaspore removal on the plant

Before bagging, there was no significant difference in infructescence height among the four groups of plants (33.4 ± 0.81 cm, $n = 126$, $KW = 0.81$, $p = 0.85$), nor in diaspore number between unbagged and bagged treatments in both open habitat (12.33 ± 0.79, $n = 66$, $KW = 0.0694$, $p = 0.79$) and woodland (7.88 ± 0.52, $n = 60$, $KW = 0.64$, $p = 0.42$).

Follicle dehiscence occurred from 19 July to 16 August 2004. In open habitat, there was no significant difference in the date of follicle dehiscence between bagged and unbagged treatments: Cox regression coefficients were not significantly different from each other (bagged tratment: $\beta = 1.21 \pm 0.44$, unbagged treatment: $\beta = 1.38 \pm 0.45$, $X^2_1 = 0.148$, $p = 0.700$). Similar results were detected in woodland habitat: Cox regression coefficient of bagged treatment was fixed to 0 and the regression coefficient of unbagged treatment ($\beta = 0.06 \pm 0.43$) was not significantly different from 0 ($X^2_1 = 0.018$, $p = 0.89$). The height above ground of infructescences in unbagged treatment did not significantly change from the date of follicle dehiscence to the date of the disappearance of the last diaspore in both open habitat ($Z = 0.396$; $p = 0.692$, $n = 31$) and woodland ($Z = 1.857$, $p = 0.063$, $n = 28$). At the date of the disappearance of the last diaspore, 25.0% of the unbagged stems in woodland and 9.7% of the stems in open habitat had their infructescence at a height above ground ≤ 15 cm, a height which allows for vertebrates to collect diaspores from the ground.

Half of the diaspores disappeared *ca.* 6 weeks after the start of the experiment in all but the bagged treatment in woodland, for which half of the diaspores had fallen inside bags four weeks later (Figure 1). There was no significant difference between bagged and unbagged treatment for the time of diaspore exposure in open habitat (β = 0.26 ± 0.35, X^2_1 = 0.53, p= 0.466). In contrast, there was a significant difference between treatments in woodland habitat (β = 0.80 ± 0.32, X^2_1 = 6.39, p = 0.011), with a shorter period of diaspore availability in unbagged treatment than in bagged treatment, meaning that dispersers and/or predators have a significant impact on diaspore removal in this habitat. In the unbagged treatment, seed removal was 2.25 times greater than seed fall from bagged infructescences (hazard ratio = 2.25, 95% confidence limits: 1.20-4.21).

3.2 Cafeteria experiment

Removal above ground

No removal above ground by animals was detected. Indeed, site, habitat and treatment had no effect on removal above ground: the best Cox PH model (i.e. with the lowest BIC) was the null model, the four models with covariates have a lower explanatory power than the model without covariates (Table I). In addition, removal rate was not significantly different between the three treatments accessible to removers and the control treatment at the end of the experiment, both in open habitat and in woodland (Figure 2), results in accordance with the models.

Removal on the ground

At ground level, the effect of treatment explained a larger part of the variation in removal rate than the effects of habitat or site. Indeed, the null model was among the models with the highest BIC values, all the models with the Treatment main effect had smaller BIC values than the null model and all the models without the Treatment main effect or an interaction with the Treatment main effect have higher BIC values than the null model (Table I). The best model was the model with only the Treatment main effect. Nevertheless, as we were interested in the differences of diaspore removal rates between the two types of habitat, we analysed the Cox PH model including Treatment and Habitat main effects (second lowest BIC), with T8 treatment (control) serving as the reference treatment so its regression coefficient (β_8) was fixed to 0. In

this model, the effect of habitat was weakly significant ($\beta = 0.34 \pm 0.17$, $X^2_1 = 3.89$, $p = 0.048$) and the probability of removal in woodland was 1.41 times more important than in open habitat, all other covariates being fixed (Habitat hazard ratio = 1.41, 95% confidence limits: 1.00-1.99). The treatments T5 (no exclusion) and T6 (birds excuded) had a significative effect on diaspore removal rate: their regression coefficients were significantly different from 0 ($\beta_{T5} = 1.94 \pm 0.28$, $X^2_1 = 49.28$, $p < 0.001$; $\beta_{T6} = 0.89 \pm 0.30$, $X^2_1 = 9.06$, $p = 0.003$) but that of T7 (birds and rodents excluded) was not ($\beta_{T7} = 0.45 \pm 0.31$, $X^2_1 = 2.05$, $p = 0.152$). The rate of diaspore removal was higher in T5 (no exclusion) than in T6 (birds excuded) ($\beta_{T5} \neq \beta_{T6}$, $X^2_1 = 22.87$, $p < 0.001$).

Small rodents (T5, T6) and other vertebrates (T5), were clearly involved in removal processes on the ground but not ants (T7), and removal rate on the ground was higher in woodland than in open habitat. Then, at the end of the experiment, removal rate was not significantly different between the four treatments in open habitat whereas it was significantly different between the four treatments in woodland (Figure 2). In woodland, the treatment T5, accessible to all removers, was the only treatment to significantly differ from the control (T8) and it did not differ significantly from T6 (birds excuded).

3.3 Diaspore and unfertilized ovule traits

When *P. officinalis* is compared to the fleshy-fruited plants ripening in summer in the study region, its pulp/diaspore volume ratio (0.05) is lower (0.58 – 0.98) and out of the range of the other species, as is the carbohydrate content of its pulp (16.6 % < 22 – 61 %). In contrast, diaspore volume (0.13 cm^3) and pulp lipid content (2.3 %) falls within the range (Figure 3). The volume of *P. officinalis* diaspores is significantly larger than that of *P. cambessedesii*, pulp/diaspore volume ratio is significantly higher in *P. cambessedesii* than in *P. officinalis* and the size of the unfertilized ovules of *P. cambessedesii* is significantly larger than that of *P. officinalis* (Table II). Moreover, the unfertilized ovules of *P. cambessedesii* are > 1.5 mm thick and bright red whereas those of *P. officinalis* are < 1.5 mm thick and pinkish. The pulp of the diaspores of *P. officinalis* contained less lipids and carbohydrates (dry mass) than those of *P. cambessedesii* (Table II).

4. Discussion

4.1. Barochory and diaspore removal

The rate of diaspore disappearance from follicles was much lower than that measured for a range of other fleshy-fruited plants in the Mediterranean region (e.g. (Herrera, 1984; Krusi and Debussche, 1988). After a 6.5 month-period of observation, no diaspore removal by animals was detected in open habitat by the two experiments: diaspores simply fell to the ground (i.e. barochory; see (Molinier and Müller, 1938; Pijl, 1972)). In the other hand, in woodland, removal on follicles reached a third of the crop but remained indetected by the cafeteria experiment. The role of rodents in removal from follicles is supported by the nibbling of follicles and unripe diaspores we observed at several times with droppings at Saint-Florent-sur-Auzonnet and in another site; to the contrary, we observed no evidence of removal neither by birds nor ants. The discrepancy in removal rates which occurred in woodland between the two experiments could be due to the set up of the cafeteria experiment which worked during a shorter observation period and offered diaspores in a less natural manner than the other experiment. Additionally, a diaspore can be removed from a box without dropping the others, whereas removing one diaspore from the infructescence causes one or several others to fall because of their closeness and precarious attachment to the follicle, which magnifies rare removal events. Whatever the case, in our study populations, *P. officinalis* appears to be a mostly barochorous species, which implies a seed rain in the closeness of the maternal plant. Previous observations showing that seedlings are seldom observed at a > 1.5 m distance from a flowering plant and are spatially aggregated down slope in close vicinity to the maternal parent (ca. 80 % at a < 0.8 m distance) support this result (Andrieu et al., 2006) in press).

Removal on the ground, estimated by the cafeteria experiment, involved a larger part of diaspores than removal above the ground and was only performed by vertebrates, without any ant intervention. However, the cafeteria experiment may overestimate removal rate by offering diaspores in a more conspicuous manner than in natural conditions where fallen diaspores may slide between gravels and stones or be embedded in the litter and harder to find. Removal on the ground was significantly lower in open habitat than in woodland and reached respectively 30.0 % and 63.3 % of the diaspores in the treatment accessible to all the vertebrates (T5), and 1.7 % and 30.0 % of the diaspores in the treatment only accessible to small rodents (T6). These results suggest that small rodents played an important role in secondary removal in woodland

but a negligible role in open habitat, and that other ground foraging vertebrates also played an important role. These other ground foraging vertebrates could be birds, but also wild boars which were not initially taken into account in our experiment.

4.3. Potential dispersers: wood mice, wild boars and birds

The wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) is very likely to be the small rodent species involved in the removal of diaspores of *P. officinalis* in the study sites: it is by far the commonest species of small rodent living in oak woodlands of the study region (Orsini, 1979) and its diet is largely composed of plant diaspores (Butet and Paillat, 1997). In the woodland, the bending downwards of stems close to the ground could have made easier the collection of diaspores by wood mice. As other small rodent species, wood mouse is both a seed predator and an effective dispersal agent. However, only a small fraction of the seeds small rodents collect and stock eventually escapes predation and is able to germinate (Jensen, 1985; Hollander and Vander Wall, 2004; Hulme and Kollmann, 2005).

At the study sites, we observed six bird species which can potentially remove *P. officinalis* diaspores: the Blackcap (*Sylvia atricapilla*), the European Robin (*Erithacus rubecula*), the Blackbird (*Turdus merula*) and the Song Thrush (*T. philomelos*) as seed dispersers, and the Great Tit (*Parus major*) and the Blue Tit (*P. coeruleus*) as pulp and seed predators ((Herrera, 1984; Snow and Snow, 1988; Debussche and Isenmann, 1989). These species collect diaspores directly on infructescences and, more unfrequently, they can also collect fallen diaspores (see e.g. ((Herrera, 1984; Snow and Snow, 1988; Debussche and Isenmann, 1989). The diaspores of *P. officinalis* show several morphological traits in accordance to ornithochory syndrome (see above: Study species), and when compared to the fruits of Mediterranean bird-dispersed plants, these diaspores are within the observed range for their size and period of exposure, though at the upper limit for this latter trait (see (Herrera, 1984, 1987; Debussche and Isenmann, 1989). However, *P. officinalis* appears to represent an outlier among bird-dispersed fleshy-fruited plants for some traits which make them poorly attractive for birds and then may reduce their probability of being dispersed by them. Indeed, the reward which can be obtained by a bird disperser (Herrera, 1982) swallowing a peony diaspore is very low compared to that provided by other fleshy-fruited plants ripening at the same time in the study region (Figure 3). Moreover,

within a week after follicle dehiscence, the pulp dries and turns into a thin peel and the colour contrast of the diaspores with the follicle interior rapidly fades, the follicle interior turning to buff-coloured (authors, pers. obs.). Finally, the morphology of the plant with a solitary and upright infructescence borne by an herbaceous stem is very uncommon among European fleshy-fruited plants and may not facilitate diaspore removal by birds. Indeed, we obtained no piece of evidence for any possible role of birds in *P. officinalis* diaspore removal during this study and during 3 yrs of additional field observation in the study sites and in 3 other sites. This is consistant with the absence of any published data on an actual dispersal of *Paeonia*'s seeds by birds, even for the long-studied species *P. cambessedesii* (no disperser is known: A. Traveset, pers. com.) and *P. broteroi* (a sole seed was collected during an extensive 3-yr seed trap experiment: P. Jordano, pers. com.), two herbaceous species morphologically very close to *P. officinalis* and showing an even more typical syndrome of ornithochory (this study, and authors, pers. obs.).

Consequently, we suggest that the difference in the removal rate between the treatment accessible to all vertebrates and the treatment accessible only to rodents is more probably due to wild boars (*Sus scrofa*), which frequently scours both sites and both habitats, than to birds. Muddy marks on boxes of the treatment T5 (no exclusion) show that wild boars removed diaspores from these boxes and even moved the boxes themselves when foraging to find invertebrates and vegetables (Gérard et al., 1991), and then took part in removal on the ground. We did not find any evidence on infructescences suggesting that wild boar looks for the diaspores of *P. officinalis* but it certainly buries, digs up and eats inadvertently some of the fallen ones.

4.4 Potential spatial pattern of dispersed seeds

The spatial pattern of dispersed seeds of a population depends on the spatial distribution of its reproductive individuals, their fecundity and their seed shadow, i.e. the spatial distribution of seeds dispersed from a single plant (Nathan and Muller-Landau, 2000). Seed shadows can be inferred from the distance and directionality of dispersal events generated by dispersal vectors (Willson and Traveset, 2000), and in the case of animal dispersers from the behaviour of these dispersers (Nathan and Muller-Landau, 2000).

The fecundity of *P. officinalis* is significantly higher in open habitat than in woodland,

with more diaspores per stem (9.76 ± 0.71, n = 67; 7.36 ± 0.67, n = 39; Mann-Whitney U test, Z = -2.13, p = 0.033) and more flowering stems per reproductive plant (1.49 ± 0.11, n = 55; 1.03 ± 0.03, n = 38; Mann-Whitney U test, Z = -2.63, p = 0.008). Moreover, flowering is limited in woodlands, especially in evergreen ones, with density of flowering plants down to 100 times lower than in open habitat (Andrieu et al., unpublished data). Thus, the amount of *P. officinalis* diaspores available for seed dispersers is by far much higher in open habitat than in woodland.

Animal behaviours suggest that most of the seeds of *P. officinalis* produced in woodland which have escaped predation by wood mice are dispersed within woodland, at a small distance from the maternal plant. Firstly, small rodents disperse most of the seeds within a 10 m distance (Jensen, 1985; Hulme and Kollmann, 2005), and frugivorous birds within a 200 m distance in patchy vegetation including trees (Debussche and Isenmann, 1994) and a few tens of metres in open habitats (Debussche et al., 1985). Second, in the Mediterranean region, small rodents (Hulme, 1997; Hulme, 1998) and frugivorous birds (Herrera and Jordano, 1981; Izhaki et al., 1991; Alcantara et al., 2000) avoid to forage in open habitats, and frugivorous birds deposit the main part of the seeds they disperse under the cover of isolated trees and in woodland (Debussche and Isenmann, 1994). Thirdly, when foraging, wild boars can move seeds over very short distances. As a fair proportion of the seeds of voluntarily ingested fleshy fruits is found unharmed in the wild boar feces (Génard and Lescourret, 1985), the long distance dispersal of *P. officinalis* by wild boars cannot be excluded, but it is undoubtedly a very exceptional event. These features lead to paradox that the highest amount of produced seeds is available in the habitat with the lowest seed disperser activity, i.e. in the woodland, whereas the lowest amount of produced seeds is available in the habitat with the highest seed disperser activity, i.e. the open habitat. We can thus hypothetize that the ecotone between woodland and open habitat, and isolated trees near this edge, could be crucial for the population dynamics of *P. officinalis* (see also Andrieu et al., in press) because it could be where both disperser activity and seed availibility occur. In the context of rapid changes in habitat suitability and landscape homogeneisation, these dispersal features could also strongly weaken escape in space of a population jeopardized by forest spread, gene flow between neighbouring populations and metapopulation functionning (Willson and Traveset, 2000; Johst et al., 2002; Levin et al., 2003).

4.5 Ornithochory syndrome and unexpected rodent dispersers

In the genus *Paeonia*, a gradient in diaspore display occurs, from small black diaspores and brightly-coloured infructescence in *P. mascula* group, including *P. cambessedesii* and *P. broteroi* (Sang et al., 1997; Halda and Waddick, 2004), to mid-sized black diaspores and less coloured infructescence in e.g. *P. officinalis*, and finally to large (up to 1.3 cm diametre) and brownish diaspores collected by rodents, in a dull infructescence, in *P.* sect. *Moutan* (Hong, 1997). It seems likely that birds weakly contribute to the dispersal of these species. Even if some of them exhibit several traits of a syndrome of ornithochory (Pijl, 1972; Herrera, 1989; this study), a few other traits, among which the very low investment in a rewarding pulp, should be crucial to explain this disinterest of birds. This feature reminds of the mimetic diaspores which resemble fleshy-fruits whose seeds are dispersed by birds, but without investing in a rewarding pulp (Pijl, 1972; (Galetti, 2002). In fact, Galetti (2002) and Pilj (1982) classify the diaspores of the genus *Paeonia* as mimetic. This plant-bird relationship is based on a visual deception of frugivores (Ridley, 1930; Pijl, 1972; Schaefer et al., 2004). Mimetic diaspores have a long time of availability (as is observed for *P. officinalis*) because of their low removal rate by birds which swallow them mistakenly. Mistakes could mostly happen when the mimetic species is unfrequent and mixed up with ornithochorous species (Peres and van Roosmalen, 1996; Foster and Delay, 1998; Galetti, 2002). At our study sites, the fleshy fruits of five species, namely *Amelanchier ovalis*, *Cornus sanguinea*, *Daphne laureola*, *Prunus mahaleb* and *Rubia peregrina*, could be those that attract birds: they locally produce much more fruit density than *P. officinalis*, their fruits are dark blue to black, ripen during *P. officinalis* diaspore availability and have a similar size (0.10 - 0.32 cm^3) but with a much higher pulp/diaspore volume ratio (0.75 - 0.85) and can be heavily consumed (see e.g. Jordano). In this context, small rodents which collect and stock the diaspores of *P. officinalis*, to consume their kernel, play an unexpected and major role in the dispersal patterns of this species which fails to attract bird dipersers but on rare occasions. We suggest that rodents play this major role across the whole *Paeonia* genus whatever could be the diaspore and infructescence display exhibited by the species.

The elaborated (*P. mascula* group) and the impoverished (*P. officinalis* group) version of the ornithochory syndrome, which respectively correspond to two distinct phylogenetic groups (sharing similar habitats (Halda and Waddick, 2004) and distributions (Sang et al., 1997), could

illustrate the effect of historical and phylogenetic constraints on contemporary diaspore traits and thus the decoupling of the origin and the maintenance of such traits (see also (Jordano, 1995).

Acknowledgements

We thank Pierre-Olivier Cheptou, Olivier Jimenez, François Munoz and John D. Thompson for helpful discussions, Anna Traveset and Pedro Jordano for providing unpublished informations, and Bruno Buatois and Anabelle Dossantos for chemical analyses. This study is included in the programme of the European Research Group "Mediterranean and Mountain Ecosystems in a Changing World" and of the Long-Term Research Area "Mediterranean Backcountry", both funded by the CNRS.

References

Alcantara J.M., Rey P.J., Sanchez-Lafuente A.M., Valera F., 2000. Early effects of rodent post-dispersal seed predation on the outcome of the plant-seed disperser interaction. Oikos 88, 362-370.

Alcantara J.M., Rey P.J., Valera F., Sanchez-Lafuente A.M., 2000. Factors shaping the seedfall pattern of a bird-dispersed plant. Ecology 81, 1937-1950.

André M.F., 1998. Depopulation, land-use change and transformation in the French Massif Central. Ambio 27, 351-353.

Andrieu E., Debussche M., Thompson J.D., 2006. The impact of forest spread on a marginal population of a protected peony (*Paeonia officinalis* L.): the importance of conserving the habitat mosaic. Biodiversity and Conservation (in press).

Baskin C.C., Baskin J.M., 1998. Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, Academic Press, London, U.K.

Bligh E.G., Dyer W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37, 911-917.

Burnham K.P., Anderson D.A., 1998. Model selection and inference - a practical information theoric approach, Springer Verlag, New York.

Butet A., Paillat G., 1997. Insectivores et rongeurs de France: le Mulot Sylvestre - *Apodemus sylvaticus* (Linné, 1758). Arvicola 9, 7-23.

Cain M.L., Milligan B.G., Strand A.E., 2000. Long-distance dispersal in plant populations. American Journal of Botany 87, 1217-1227.

Daget P., 1977. Mediterranean bioclimate - General characteristics and modes of definition. Vegetatio 34, 1-20.

Debussche M., 1988. La diversité morphologique des fruits charnus en Languedoc méditerranéen: relations avec les caractéritiques biologiques et la distribution des plantes, et avec les disséminateurs. Acta Oecologica 9, 37-52.

Debussche M., Cortez J., Rimbault I., 1987. Variation in fleshy fruit composition in the Mediterranean region: the importance of ripening season, life form, fruit type and geographical distribution. Oikos 49, 244-252.

Debussche M., Isenmann P., 1989. Fleshy fruit characters and the choices of bird and mammal seed dispersers in a mediterranean region. Oikos 56, 327-338.

Debussche M., Isenmann P., 1994. Bird-dispersed seed rain and seedling establishment in patchy mediterranean vegetation. Oikos 69, 414-426.

Debussche M., Lepart J., Dervieux A., 1999. Mediterranean landscape change: evidence from old postcards. Global Ecology and Biogeography 8, 3-15.

Debussche M., Lepart J., Molina J., 1985. La dissémination des plantes à fruits charnus par les oiseaux: rôle de la structure de la végétation et impact sur la succession en région méditerranéenne. Acta Oecologica 6, 65-80.

Delcros P., 1994. Landscape ecology and post-cultural plant dynamics in mountain areas.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28, 350-356.

Foster M.S., Delay L.S., 1998. Dispersal of mimetic seeds of three species of *Ormosia* (Leguminosae). Journal of Tropical Ecology 14, 389-411.

Fréville H., Justy F., Olivieri I., 2001. Comparative allozyme and microsatellite population structure in a narrow endemic plant species, Centaurea corymbosa Pourret (Asteraceae). Molecular Ecology 10, 879-889.

Galetti M., 2002. Seed dispersal of mimetic fruits: parasitism, mutualism, aposematism or exaptation? In: Levey D.J., Silva W.R., Galetti M. (Ed.), Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation, CAB International, New York, US.

Gaston K.J., Kunin W.E., 1997. Rare-common differences: an overview. In: Kunin W.E., Gaston K.J. (Ed.), The biology of rarity, Chapman & Hall, London, U.K.
Génard M., Lescourret F., 1985. Le Sanglier (*Sus scrofa scrofa* L.) et les diapores dans le Sud de la France. Revue D Ecologie-La Terre Et La Vie 40, 343-353.
Gérard J.F., Teillaud P., Spitz F., Mauget R., Campan R., 1991. Le Sanglier. Revue d'Ecologie - La Terre et la Vie suppl. 6, 11-66.
Halda J.J., Waddick J.W., 2004. The genus Paeonia, Timber Press Inc., Portland, U.S.
Harms K.E., Wright S.J., Calderon O., Hernandez A., Herre E.A., 2000. Pervasive density-dependent recruitment enhances seedling diversity in a tropical forest. Nature 404, 493-495.
Herrera C.M., 1982. Seasonal-variation in the quality of fruits and diffuse coevolution between plants and avian dispersers. Ecology 63, 773-785.
Herrera C.M., 1984. A study of avian frugivores, bird-dispersed plants, and their interaction in Mediterranean scrublands. Ecological Monographs 54, 1-23.
Herrera C.M., 1987. Vertebrate-dispersed plants of the Iberian Peninsula - a study of fruit characteristics. Ecological Monographs 57, 305-331.
Herrera C.M., 1989. Frugivory and seed dispersal by carnivorous mammals, and associated fruit characteristics, in undisturbed Mediterranean habitats. Oikos 55, 250-262.
Herrera C.M., Jordano P., 1981. *Prunus mahaleb* and birds - the high-efficiency seed dispersal system of a temperate fruiting tree. Ecological Monographs 51, 203-218.
Hollander J.L., Vander Wall S.B., 2004. Effectiveness of six species of rodents as dispersers of singleleaf pinon pine (*Pinus monophylla*). Oecologia 138, 57-65.
Hong D.Y., 1997. *Paeonia* (Paeoniacea) in Xizang (Tibet). Novon 7, 156-161.
Hulme P.E., 1997. Post-dispersal seed predation and the establishment of vertebrate dispersed plants in Mediterranean scrublands. Oecologia 111, 91-98.
Hulme P.E., 1998. Post-dispersal seed predation: consequences for plant demography and evolution. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 1, 32-46.
Hulme P.E., Kollmann J., 2005. Seed predator guilds, spatial variation in post-dispersal seed predation and potential effects on plant demography: a temperate perspective. In: Forget P.-M., Lambert J.E., Hulme P.E., Vander Wall S.B. (Ed.), Seed fate: predation, dispersal and seedling establishment, CAB International, Wallingford, UK.
Izhaki I., Walton P.B., Safriel U.N., 1991. Seed shadows generated by frugivorous birds in an eastern mediterranean scrub. Journal of Ecology 79, 575-590.
Jensen T.S., 1985. Seed-seed predator interactions of european beech, *Fagus silvatica* and forest rodents, *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*. Oikos 44, 149-156.
Johnson J.B., Omland K.S., 2004. Model selection in ecology and evolution. Trends in Ecology & Evolution 19, 101-108.
Johst K., Brandl R., Eber S., 2002. Metapopulation persistence in dynamic landscapes: the role of dispersal distance. Oikos 98, 263-270.
Jordano P., 1995. Angiosperm fleshy fruits and seed dispersers: a comparative analysis of adaptation and constraints in plant-animal interactions. American Naturalist 154, 163-191.
Kalisz S., Hanzawa F.M., Tonsor S.J., Thiede D.A., Voigt S., 1999. Ant-mediated seed dispersal alters pattern of relatedness in a population of *Trillium grandiflorum*. Ecology 80, 2620-2634.
Kelrick M.I., Macmahon J.A., Parmenter R.R., Sisson D.V., 1986. Native seed preferences of shrub-steppe rodents, birds and ants - the relationships of seed attributes and seed use. Oecologia 68, 327-337.
Kleinbaum D.G., 1996. Survival analysis, a self-learning text, Springer-Verlag, New York.
Kollmann J., Coomes D.A., White S.M., 1998. Consistencies in post-dispersal seed predation

of temperate fleshy-fruited species among seasons, years and sites. Functional Ecology 12, 683-690.
Koricheva J., Larsson S., Haukioja E., 1998. Insect performance on experimentally stressed woody plants: A meta-analysis. Annual Review of Entomology 43, 195-216.
Krusi B.O., Debussche M., 1988. The fate of flowers and fruits of *Cornus sanguinea* L. in 3 contrasting mediterranean habitats. Oecologia 74, 592-599.
Lavergne S., Thompson J.D., Garnier E., Debussche M., 2004. The biology and ecology of endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. Oikos 107, 505-518.
Lepart J., Debussche M., 1992. Human impact on landscape patterning: Mediterranean examples. In: Hansen J.A., di Castri F. (Ed.), Landscape boundaries, consequences for biotic diversity and ecological flows, Springer, New York, pp. 76-106.
Levin S.A., Muller-Landau H.C., Nathan R., Chave J., 2003. The ecology and evolution of seed dispersal: A theoretical perspective. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 34, 575-604.
Médail F., Ziman S., Boscaiu M., Riera J., Lambrou M., Vela E., Dutton B., Ehrendorfer F., 2002. Comparative analysis of biological and ecological differentiation of *Anemone palmata* L. (Ranunculaceae) in the western Mediterranean (France and Spain): an assessment of rarity and population persistence. Botanical Journal of the Linnean Society 140, 95-114.
Molinier R., Müller P., 1938. La dissémination des espèces végétales, Imprimerie André Lesot, Paris.
Nathan R., Muller-Landau H.C., 2000. Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. Trends in Ecology and Evolution 15, 278-284.
Ne'eman G., 2003. To be or not to be - the effect of nature conservation management on flowering of *Paeonia mascula* (L.) Miller in Israel. Biological Conservation 109, 103-109.
Peres C.A., van Roosmalen M.G.M., 1996. Avian dispersal of ‚'mimetic seeds'' of *Ormosia lignivalvis* by terrestrial granivores: deception or mutualism? Oikos 75, 249-258.
Petit R.J., Pineau E., Demesure B., Bacilieri R., Ducousso A., Kremer A., 1997. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 9996-10001.
Pijl L.v.d., 1972. Principles of dispersal in higher plants, Springer-Verlag, New York.
Prieur-Richard A.H., Lavorel S., Linhart Y.B., Dos Santos A., 2002. Plant diversity, herbivory and resistance of a plant community to invasion in Mediterranean annual communities. Oecologia 130, 96-104.
Primack R.B., Miao S.L., 1992. Dispersal can limit local plant distribution. Conservation Biology 6, 513-519.
Ridley H.N., 1930. The dispersal of plants throughout the world, Reeve L. and Co, Ashford, U.K.
Russell S.K., Schupp E.W., 1998. Effects of microhabitat patchiness on patterns of seed dispersal and seed predation of *Cercocarpus ledifolius* (Rosaceae). Oïkos 81, 434-443.
Sala O.E., Chapin F.S., Armesto J.J., Berlow E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald E., Huenneke L.F., Jackson R.B., Kinzig A., Leemans R., Lodge D.M., Mooney H.A., Oesterheld M., Poff N.L., Sykes M.T., Walker B.H., Walker M., Wall D.H., 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. Science 287, 1770-1774.
Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F., 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniceae). American Journal of Botany 84, 1120-1136.
SAS Institute Inc., 1999. SAS/STAT user's guide, Cary.
Schaefer H.M., Schaefer V., Levey D.J., 2004. How plant-animal interactions signal new

insights in communication. Trends in Ecology & Evolution 19, 577-584.
Schmidt V., Schaefer H.M., Winkler H., 2004. Conspicuousness, not colour as foraging cue in plant-animal signalling. Oikos 106, 551-557.
Snow B., Snow D., 1988. Birds and berries, a study of an ecological interaction, T. & A.D. Poyser, Calton, U.K.
Turnbull C.L., Culver D.C., 1983. The timing of seed dispersal in *Viola nuttallii* - attraction of dispersers and avoidance of predators. Oecologia 59, 360-365.
Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., 1993. Flora Europaea, Cambridge University Press, Cambridge.
Vellend M., Myers J.A., Gardescu S., Marks P.L., 2003. Dispersal of Trillium seeds by deer: Implications for long-distance migration of forest herbs. Ecology 84, 1067-1072.
Wang B.C., Smith T.B., 2002. Closing the seed dispersal loop. Trends in Ecology & Evolution 17, 379-385.
Weiblen G.D., Thomson J.D., 1995. Seed dispersal in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae). Oecologia 102, 211-219.
Willson M.F., Graff D.A., Whelan C.J., 1990. Color preferences of frugivorous birds in relation to the colors of fleshy fruits. Condor 92, 545-555.
Willson M.F., Thompson J.N., 1982. Phenology and ecology of color in bird-dispersed fruits, or why some fruits are red when they are green. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 60, 701-713.
Willson M.F., Traveset A., 2000. The ecology of seed dispersal. In: Fenner M. (Ed.), Seeds: the ecology of regeneration in plant communities, CAB International, Wallingford, UK.

Above ground removal		On the ground removal	
Models	**BIC**	**Models**	**BIC**
Null model	981.928	T	975.367
S	984.708	T H	976.49
T	994.927	T S	978.534
S T	997.711	T H S	979.42
S T S*T	1005.621	T H S S* H	982.44
		T H H *T	983.93
		T H S H *T	986.635
		T H S S* H H *T	989.622
		T S S*T	993.092
		T H S S*T	994.033
		T H S S* H S*T	997.07
		T H S H *T S*T	1001.15
		T H S S* H H *T S*T	1003.8
		Null model	1033.4
		H	1035.05
		S	1036.55
		H S	1038.06
		H S S* H	1041.72

Table I: Summary of the BIC scores of the different models tested for the above ground and on the ground removal of diaspores with the 3 effects (S = site, H = habitat and T = treatment) and their second order interaction. Models are ranked by their BIC score (AIC scores give similar results but tend to penalize simple models).

	P. officinalis	*P. cambessedesii*	*Z*
diaspore vol. (mm^3)	126.4 ±3.5	107.6 ± 2.3	-4.09***
% pulp/diaspore	5.1 ± 0.5	12.2 ± 1.3	4.31***
ovule area (mm^2)	6.0 ± 0.5	23.5 ± 1.2	6.59***
% of carbohydrates	16.6	36.0	
% of lipids	2.3	1.7	

*** $p < 0.001$

Table II: Mean ± SE values of diaspore traits in *Paeonia officinalis* and *P. cambessedesii* (Mann Whitney U-tests, n = 30 for each species).

Figure legends

Figure 1: Decrease with time in the proportion of diaspores on the carpels remaining since the start of the experiment at Vissec, in the open habitat (thin lines) and in the woodland (thick lines) for unbagged (dotted lines) and bagged (filled lines) treatments.

Figure 2: Mean number and standard error of diaspores removed out of the boxes at the end of the cafeteria experiment per treatment and habitat (n = 12). (A): above ground removal (treatments 1-4) in open habitat, (B): above ground removal in woodland, (C): on the ground removal (treatment 5-8) in open habitat, (D): on the ground removal in woodland. Code letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) following Dunn's test for multiple comparisons after Kruskal Wallis nonparametric analysis of variance ((A): KW = 4.1434, p = 0.246; (B): KW = 0.3325, p = 0.954; (C): KW = 6.8699, p = 0.076; (D): KW = 18.7352, $p < 0.001$)).

Figure 3: Morphological (A) and chemical (B) traits of *P. officinalis* (filled circle) and *P. cambessedesii* (open circle) diaspores in comparison with summer fruiting fleshy-fruited species of the study region (open diamonds).

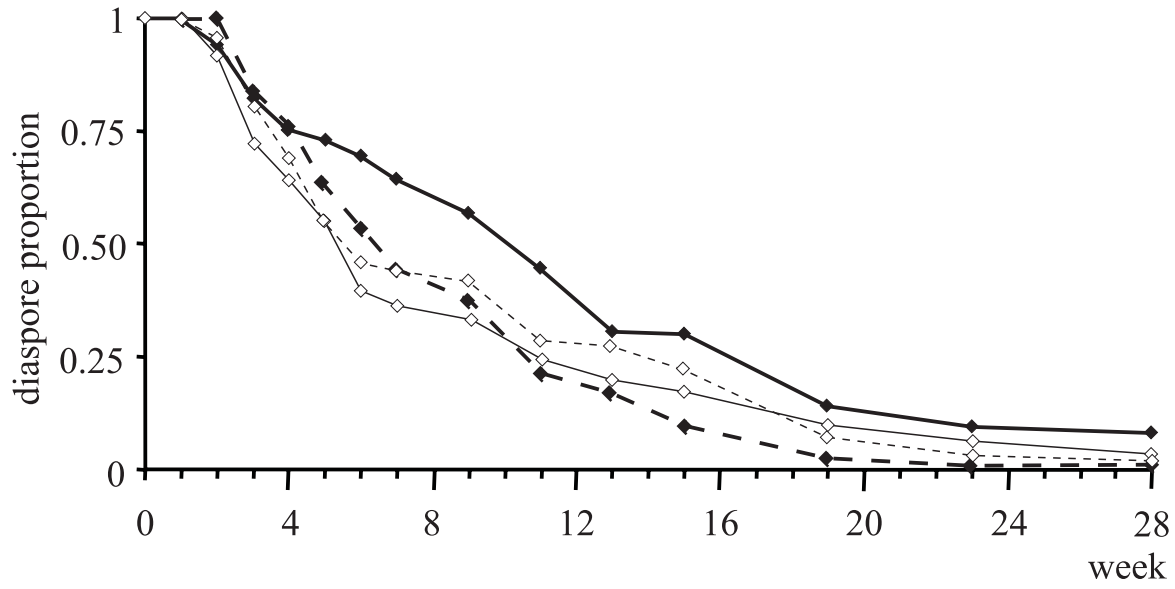


Figure 1

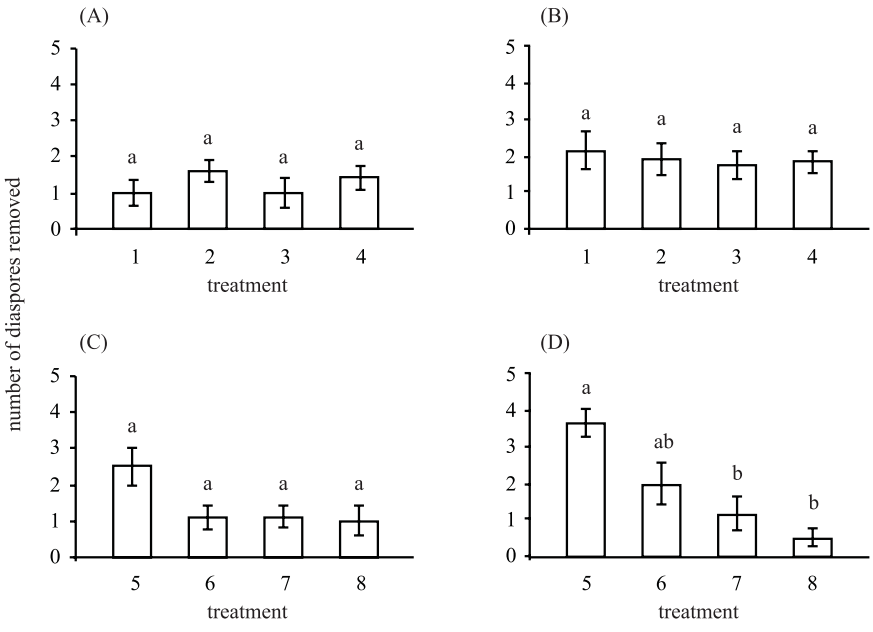


Figure 2

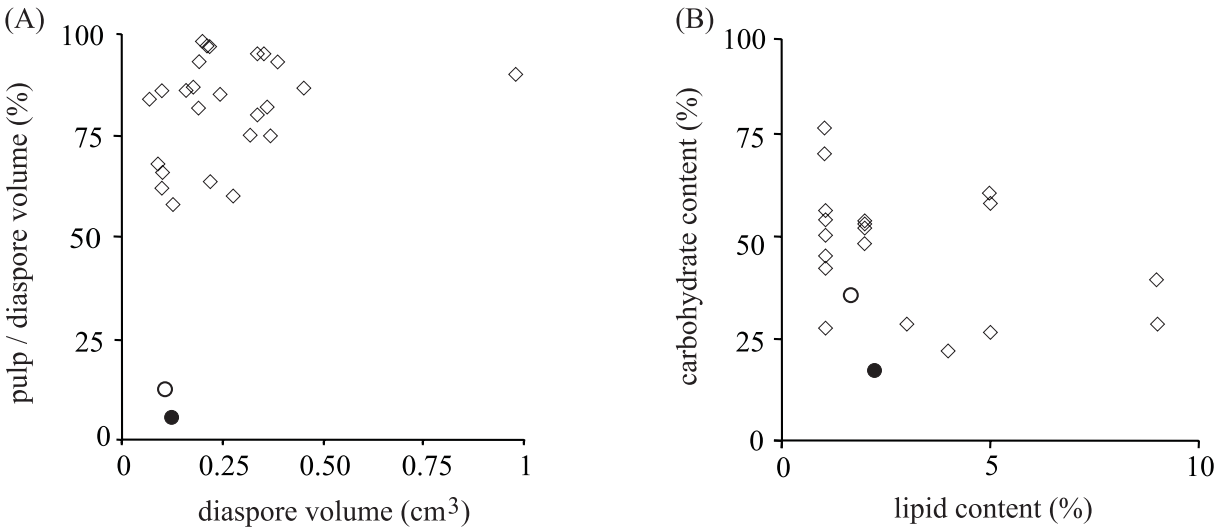

(A)
100
75
50
25
0
pulp / diaspore volume (%)
0
0.25
0.50
0.75
1
diaspore volume (cm3)
(B)
100
75
50
25
0
carbohydrate content (%)
0
5
10
lipid content (%)

Figure 3