



HAL
open science

Evolution et systématique du genre *Arundo* L. (Poaceae), et conservation d'une endémique ligurienne : interactions Homme/Biodiversité en Méditerranée

Laurent Hardion

► To cite this version:

Laurent Hardion. Evolution et systématique du genre *Arundo* L. (Poaceae), et conservation d'une endémique ligurienne : interactions Homme/Biodiversité en Méditerranée. Systématique, phylogénie et taxonomie. Aix Marseille Université, 2013. Français. NNT : 10234104 . tel-01164052

HAL Id: tel-01164052

<https://hal.science/tel-01164052>

Submitted on 16 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Aix-Marseille Université

**Evolution et systématique du genre *Arundo* L.
(Poaceae), et conservation d'une endémique ligure :
interactions Homme/Biodiversité en Méditerranée**

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université d'Aix-Marseille

Faculté des Sciences de Saint Charles

Discipline : Biologie des populations et écologie

Présentée et soutenue par

Laurent Hardion

Le 26 Novembre 2013

Co-encadré par Régine Verlaque et Bruno Vila

Ecole doctorale : Sciences de l'Environnement (EDSE 251)

Jury

| | | |
|------------------------------|---|---------------------|
| M. Josep A. Rosselló | Professeur de l'Université de Valencia | Rapporteur |
| M. Peter Schönswetter | Professeur de l'Université d'Innsbruck | Rapporteur |
| M. John D. Thompson | Directeur de Recherche au CEFÉ-CNRS | Examineur |
| M. Frédéric Médail | Professeur d'Aix-Marseille Université | Examineur |
| Mme Régine Verlaque | Chargée de Recherche à l'IMBE-CNRS | Directrice |
| M. Bruno Vila | Maître de Conférence d'Aix-Marseille Université | Co-directeur |

« J'vais voir si c'est ainsi ! que je crie à Arthur, et me voici parti à m'engager, et au pas de course encore.

– T'es rien c... Ferdinand ! » qu'il me crie, lui Arthur en retour, vexé sans aucun doute par l'effet de mon héroïsme sur tout le monde qui nous regardait.

Ça m'a un peu froissé qu'il prenne la chose ainsi, mais ça m'a pas arrêté. J'étais au pas. « J'y suis, j'y reste ! » que je me dis.

« On verra bien, eh navet ! » que j'ai même encore eu le temps de lui crier avant qu'on tourne la rue avec le régiment derrière le colonel et sa musique. Ça s'est fait exactement ainsi.

Alors on a marché longtemps. Y en avait plus qu'il y en avait encore des rues, et puis dedans des civils et leurs femmes qui nous poussaient des encouragements, et qui lançaient des fleurs, des terrasses, devant les gares, des pleines églises. Il y en avait des patriotes ! Et puis il s'est mis à y en avoir moins des patriotes... La pluie est tombée, et puis encore de moins en moins et puis plus du tout d'encouragements, plus un seul, sur la route.

Nous n'étions donc plus rien qu'entre nous ? Les uns derrière les autres ? La musique s'est arrêtée. « En résumé, que je me suis dit alors, quand j'ai vu comment ça tournait, c'est plus drôle ! C'est tout à recommencer ! » J'allais m'en aller. Mais trop tard ! Ils avaient refermé la porte en douce derrière nous les civils. On était faits, comme des rats.

Louis Ferdinand Céline, *Voyage au bout de la nuit*

A la mémoire de M.M.,
les petites choses font les grands machins

Remerciements

Outre l'assiduité du doctorant, ces travaux ont bénéficié de la complémentarité de mes directeurs de thèse. Je remercie Bruno Vila en tant que porteur de projet et financeur de mes caprices moléculaires, mais aussi pour sa confiance et son soutien. Merci de m'avoir laissé faire cette thèse avec le sourire. L'Etna nous attend encore. J'ai également passé ces trois années de thèse aux côtés de Régine Verlaque, à qui j'adresse ma profonde reconnaissance pour m'avoir laborieusement transmis de très nombreuses connaissances, mais aussi et surtout, un éveil scientifique et un sens de l'observation qui n'égalera jamais le sien. Merci à Frédéric Médail, présent à l'ouverture et à la fermeture de cette thèse, mais aussi en tant que récolteur chevronné. Merci à John Thompson pour son intérêt envers mes travaux à la fois rassurant et stimulant. A l'éminent Pr. Rosselló, merci Josep de m'avoir accueilli aussi chaleureusement à Valencia, mais aussi à Marcella Rosato pour m'avoir formé à la cytogénétique moléculaire. J'adresse aussi ma reconnaissance à Peter Schönswetter pour avoir accepté avec enthousiasme d'évaluer mon travail. Esprit fantomatique et colonne de ma formation universitaire, je remercie une nouvelle fois Alex Baumel. A la base de mes travaux, j'adresse ma profonde reconnaissance à l'ensemble des récolteurs cités dans cette thèse et ayant collecté un matériel peu attractif par amitié et par intérêt scientifique. Je remercie tout particulièrement les membres du CBNMéd pour leurs multiples contributions. Au même titre, je remercie tout le personnel des herbiers visités durant cette thèse m'ayant permis de poursuivre mon travail taxonomique à distance. Au premier rang de ces derniers, j'ai été aidé et soutenu par le staff de MARS Herbarium, et je remercie donc Françoise Fleury, Christiane Vignal et Pierre Donadille. Expertes de la double hélice, Marianick Juin et Nathalie Duong m'ont rendu bien des services, et toujours avec le sourire. Je remercie également Bruno Fady et Anne Roig de l'INRA d'Avignon pour leur aide technique. Mes interactions au sein de mon équipe MacroBio, animée par Alberte Bondeau, ainsi qu'avec l'équipe DFME, voisins d'étage, m'ont été utiles et agréables. En prolongement, j'adresse ma reconnaissance à mon institut de recherche, l'IMBE, ainsi qu'à son personnel, et espère avoir été un digne représentant. Je remercie tout particulièrement Nathalie Polvani pour avoir 'géré' mes gros sous sans trop piquer dans la caisse. Je remercie aussi mes stagiaires, Flora Druetz et Kévin Lhoyer, pour leurs bonnes volontés et humeur. J'adresse ma reconnaissance aux acteurs de la conservation à Fréjus, le service environnement de Fréjus, Fabien Walicki et Frédéric Ferrero, mais aussi Samuel Pauvert (DREAL PACA), pour leur soutien et leur financement. Ces travaux ont aussi été financés par le programme PIRVE (CNRS et Ministère de l'Ecologie), la fédération de recherche ECCOREV (CNRS) et la Société Botanique de France. Si je déplore encore le peu de collaboration dans mes travaux, j'ai tout de même pu réfléchir, voir travailler, aux côtés Agathe Leriche (et on a bien rigolé), Daniel Pavon, Carole Barthélémy, Pascal-Antoine Christin et Kristin Saltonstall. Toute mon affection à mes 'sparring partners' de thèse, moteurs de Recherche et chercheurs de sens à durée presque déterminée : Marine Puget, Marie-Sessile le Pommier, Annabelle Miam, Encas Tripop, Aïda Verdi, Alma & Julie, Mathilde Chamel, Annecy Rielle, Anaïs, mais aussi ces messieurs Migliore, Dumas, Baumberger, Monnier, Santonja, Yousseff, Rizvi, et bien d'autres encore, Julien, Aude, Natalia, Anna, Veronika, la Recherche avance dans vos pas hésitants, et avec le sourire encore. A la Biquette du Racati. Ces cinq années passées à Marseille ne m'auront pas permis de rencontrer J.J.G., mais cette thèse restera imprégnée des albums d'Electrelane, Ratatat, Elysian Fields, Brian Jonestown Massacre, The Dead Weather, Neil Young, The Kills, Lovage, Nina Simone, Katerine, Soft Machine, Gossip, Deportivo, Nino Ferrer, John Frusciante, Ed Banger, Youngblood Brass Band, et jusqu'aux Poppys, Starmania et Daft Punk. Militons pour la diffusion des playlists en matériel supplémentaire (datadryad.org/playlists/). Merci aux drôles, Poelvoorde, Esquerre, Desproges, De Funès, Ace Ventura, Dale Cooper, SpongeBob et jusqu'aux plus sérieux d'entre nous. Aux complices stylisés, L.F. Céline, M. Houellebecq et N. Sarraute. L'imaginaire parasité par les scènes de Rohmer, Clouzot, Mouret et Brisseau, d'Antonioni, Bellocchio et Moretti, jusqu'à Kubrick et Tarkovski. Mi-fier mi-amère envers Laxrouge, entreprise sans suite ni précédent ; et je ne vous saluerai même pas, messieurs. Merci à mes plus proches parents, pour avoir trouvé tout ça normal, logique, et même bien, d'avoir accepté sans mot dire, comme si...

Tu as vu, j'ai fini. Je te l'avais dit, juste trois ans. J'arrête les bêtises maintenant, je rentre. Mais avoue, c'était marrant ?

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| I. Introduction générale | 1 |
| I.1. Interactions Homme-Biodiversité en Méditerranée | 3 |
| I.1.1. Différenciation de la flore méditerranéenne..... | 3 |
| I.1.2. Erosion de la biodiversité méditerranéenne | 5 |
| I.1.3. Modification, domestication et homogénéisation | 6 |
| I.1.4. Inflation taxonomique | 7 |
| I.2. Vers une taxonomie intégrative | 8 |
| I.2.1. Crise et renouveau de la taxonomie | 9 |
| I.2.2. Notion(s) d'espèce..... | 12 |
| I.3. Modèle d'étude | 15 |
| I.3.1. Genèse du sujet : Conservation d' <i>Arundo plinii s.l.</i> à Fréjus | 15 |
| I.3.2. Taxonomie du genre <i>Arundo</i> | 16 |
| I.3.3. Morphologie et écologie du genre <i>Arundo</i> | 17 |
| I.3.4. Objectifs de la thèse | 20 |
| II. Systématique du genre <i>Arundo</i> en Méditerranée | 23 |
| Synthèse et perspectives | 25 |
| Annexes | 33 |
| - Manuscrit A : Hardion <i>et al.</i> 2012. Nomenclature d' <i>Arundo micrantha</i> | 35 |
| - Manuscrit B : Hardion <i>et al.</i> 2011. <i>In</i> Marhold. Chromosome data 11 | 39 |
| - Manuscrit C : Hardion <i>et al.</i> 2012. Systematics of <i>Arundo</i> | 43 |
| III. Phylogéographie d'<i>A. plinii</i> et origine d'<i>A. donaciformis</i> | 53 |
| Synthèse et éléments de discussion | 55 |
| Annexes | 59 |
| - Manuscrit D : Hardion <i>et al.</i> 2013. <i>In</i> Marhold. Chromosome data 15 | 61 |
| - Manuscrit E : Hardion <i>et al.</i> under review. Phylogeography of <i>Arundo plinii</i> | 65 |

| | |
|--|------------|
| IV. Conservation d'<i>Arundo donaciformis</i> à Fréjus | 101 |
| Synthèse détaillée | 103 |
| Annexes | 129 |
| - Manuscrit F : Vila <i>et al. in press.</i> Espèce méditerranéenne menacée et aménagements urbains : le cas d' <i>Arundo plinii</i> à Fréjus. Livre blanc PIRVE (CNRS) | 131 |
| - Manuscrit G : Hardion <i>et al. in prep.</i> Conservation of <i>Arundo donaciformis</i> | 145 |
| - Manuscrit H : Hardion <i>et al. in prep.</i> Impact of polyploidy in <i>Arundo</i> | 169 |
| | |
| V. Origine des clones méditerranéens d'<i>Arundo donax</i> et <i>A. micrantha</i> en Asie..... | 175 |
| Synthèse et perspectives | 177 |
| Annexes | 183 |
| - Manuscrit I : Hardion & Leriche. <i>in prep.</i> Plant distribution on Google Str. View . | 185 |
| - Manuscrit J : Hardion <i>et al. in prep.</i> Origin of the invasive <i>Arundo donax</i> | 199 |
| | |
| VI. Discussion générale | 221 |
| VI.1. Liens entre le genre <i>Arundo</i> et l'Homme | 223 |
| VI.2. Notion d'espèce clonale et taxonomie intégrative | 224 |
| VI.3. Impacts de la polyploïdie dans le genre <i>Arundo</i> | 226 |
| VI.4. Impacts des changements climatiques sur le genre <i>Arundo</i> | 229 |
| | |
| VII. Perspectives..... | 231 |
| VII.1. Expertise scientifique des transplantations d' <i>Arundo donaciformis</i> à Fréjus..... | 233 |
| VII.1. Elaboration d'un plan de conservation pour <i>Arundo donaciformis</i> à Fréjus..... | 244 |
| VII.3. Systématique et phylogéographie des <i>Arundo</i> à Taïwan..... | 248 |
| VII.4. Origine du genre <i>Arundo</i> : phylogénie des Arundinoideae | 249 |
| | |
| Références | 253 |

I. Introduction générale

Les forçages principaux structurant la biodiversité dans le Bassin Méditerranéen comprennent : une topographie complexe, un climat très particulier et une forte présence humaine. Si les impacts humains anciens ont façonné la flore, l'anthropisation actuelle la menace gravement, d'autant plus que les secteurs à forte densité humaine coïncident avec les zones refuges et les hotspots. La population des pays méditerranéens est passée de 225 millions en 1950 à 450 millions en l'an 2000 (111 habitants/km²) et pourrait atteindre 550 millions en 2025, au ¾ concentrée dans les villes et le long des côtes (Quézel 1995 ; Médail 2005). Parmi les 10 hotspots régionaux de forte biodiversité identifiés dans ce bassin, la France en compte deux: les régions Provence (PACA) et Corse (Médail et Quézel 1997). Or, sur les 680 taxons protégés et/ou prioritaires en France (Danton & Baffray 1995 ; Olivier *et al.* 1995), 73% habitent le seul Sud-Est et 41% sont des endémiques.

Pour estimer et comparer la biodiversité végétale de certaines régions, on utilise la richesse spécifique et le taux d'endémisme, sans savoir ce que représentent ces taxons à aires restreintes et/ou morcelées. En fait, l'endémisme résulte tout autant de phénomènes de conservation que de différenciation récente, comme l'a prouvé une classification basée sur leurs parentés morphologiques et cytogénétiques (Favarger & Contandriopoulos 1961). Leur pourcentage correspond au nombre de taxons endémiques d'un territoire biogéographique donné, par rapport au nombre de taxons indigènes de la même région. Toutes ces évaluations reposent donc sur la notion d'espèce, la distinction entre taxon indigène et introduit, et la délimitation des endémiques. Comme nous l'avons constaté durant ce travail, tous ces concepts de prime abord intuitifs représentent autant de pièges, et soulèvent d'innombrables questions tant pratiques que théoriques.

I.1. Interactions Homme-Biodiversité en Méditerranée

I.1.1. Différenciation de la flore méditerranéenne

Le bassin méditerranéen commence à prendre forme à la fin du Miocène (7 Ma) par la soudure à l'Est des plaques Africaine et Eurasienne. Cette collision a provoqué une orogénèse intense, la fragmentation de plusieurs plaques et la création d'innombrables îles. L'événement le plus marquant du Tertiaire reste la crise de salinité du Messinien (6-5,3 Ma) avec la fermeture totale et l'assèchement de la Méditerranée. Malgré son impact théorique sur la

distribution des espèces, les conséquences d'un tel bouleversement demeurent peu comprises en biogéographie (Fiz-Palacios & Valcarcel 2013). Entre 3,5 et 2,6 Ma, le bioclimat méditerranéen s'installe progressivement, avec l'apparition d'un rythme thermique saisonnier marqué, de sécheresse estivale et d'hivers frais (Suc 1984 ; Fauquette *et al.* 2007 ; Jimenez-Moreno *et al.* 2010). Durant cette période, la végétation méditerranéenne se met en place, composée d'un héritage tertiaire de ligneux sclérophylles (groupe pré-Pliocène) et de genres à diversification quaternaire marquée (*e.g.* *Cistus*, *Dianthus*, *Thymus* ; groupe post-Pliocène ; Quézel & Médail 2003).

Le début du Quaternaire, fixé récemment à 2,58 Ma, se caractérise par l'apparition des premiers vrais cycles glaciaires/interglaciaires marqués (Gibbard *et al.* 2010). Les péninsules nord méditerranéennes deviennent alors des terres de refuges pour les lignées européennes, ainsi que des zones très propices à l'évolution de la flore, comparées aux régions plus septentrionales décimées par les glaciations successives (Comes & Kadereit 1998). En périodes interglaciaires, le climat de la Méditerranée, de type subtropical sec à forte saisonnalité, avec des hivers doux et des étés chauds et secs, occasionne d'importants incendies auxquels la flore s'est adaptée par diverses stratégies (Thompson 2005). De plus, les migrations et les mélanges de flores associés aux pulsations climatiques du Quaternaire ont joué un rôle majeur sur la flore, en y laissant une empreinte indélébile. En effet, les chocs thermiques et les hybridations constituent les causes essentielles de la formation naturelle des polyploïdes.

Résultat de cette histoire géo-climatique des plus complexes, le Bassin Méditerranéen constitue une des zones les plus riches du monde en plantes vasculaires, avec 25 000 espèces, dont plus de la moitié endémique (Quézel 1985), ou 30 000 espèces et sous-espèces, dont 60% d'endémiques *s.l.* parfois très rares (Greuter 1994). De plus, cette flore partage avec celle d'Europe des taxons tempérés (suite aux recolonisations post-glaciaires), et comprend aussi de nombreux éléments irano-touraniens et quelques taxons sino-himalayens.

I.1.2. Erosion de la biodiversité méditerranéenne

Depuis la Préhistoire, des interactions très fortes unissent Homme et végétation. Les auteurs font débiter l'impact significatif de l'Homme sur les paysages méditerranéens à 50 000 BP (Naveh & Dan 1973). Les premières disparitions d'espèces causées par les chasseurs-cueilleurs portèrent sur la mégafaune, en particulier insulaire (Simmons 1988 ; Diamond 2002). Le principal impact de l'Homme en Méditerranée demeure le déboisement, conséquence de trois activités principales : agriculture, exploitation du bois et pâturage. Dès le Néolithique, l'usage du feu pour défricher et fertiliser les sols a durablement affecté les forêts et l'ensemble du paysage (Pons & Thion 1987). En haute altitude, le déboisement a permis l'augmentation des surfaces de pâturage (Talon *et al.* 1998). La déforestation provoque l'augmentation du ruissellement et de l'érosion. Elle induit aussi la diminution du patrimoine génétique de certains taxons forestiers emblématiques comme le cèdre du Liban *Cedrus libani* A.Rich. (Fady *et al.* 2008). Cependant, si les forêts méditerranéennes actuelles n'occupent qu'environ 10% du domaine méditerranéen, elles n'ont jamais couvert sa totalité, en raison de l'existence de milieux naturels ouverts de type pelouses et steppes (Grove & Rackham 2003).

Si la déprise agricole récente a permis l'extension des formations (pré-)forestières au nord de la Méditerranée, l'industrialisation et l'urbanisation croissantes du littoral ont drastiquement transformé les paysages méditerranéens (Médail & Quézel 1999, Médail & Diadema 2006). Toutefois les milieux les plus touchés sont de loin ceux de basse altitude, où la pression anthropique s'avère la plus forte (Médail & Verlaque 1997). Les dégradations présentent trois conséquences majeures, par la perte : (i) d'effectifs entraînant la chute de potentiel de persistance face à la stockasticité des perturbations, (ii) d'habitats *per se*, et donc de variabilité environnementale, et (iii) de populations, *i.e.* de variabilité génétique infra-spécifique. Dans le cadre de changements globaux ou de perturbations croissantes, ces trois effets réduisent fortement les capacités d'adaptabilité et de persistance des taxons rares, pouvant entraîner des régressions voire des extinctions. Juste après les espèces des zones anthropisées, celles des milieux humides sont les plus touchées par la destruction de leur habitat, déjà très vulnérables en Méditerranée (*e.g.* assèchement des eaux stagnantes, chenalisation des cours d'eau, pollution ; Verlaque *et al.* 2001), et par la présence de multiples invasives très compétitives (Verlaque *et al.* 2002).

I.1.3. Modification, domestication et homogénéisation

Outre les dégradations, les activités anthropiques constituent de véritables forces structurantes des écosystèmes méditerranéens. Le Néolithique demeure une étape cruciale pour la modification de la biodiversité méditerranéenne (Zohary *et al.* 2012). La domestication de plantes et d'animaux a permis la dispersion de nombreux 'taxons utiles', souvent à partir du Proche-Orient (Vavilov 1935). Voyageant avec les semences, certaines plantes (messicoles, ségétales, anthropozoogènes) ont été introduites accidentellement, constituant une première étape de l'homogénéisation de la biodiversité. Ainsi certaines espèces ne présentent pas de patron phylogéographique clair, conséquence d'une dispersion humaine répétée (*e.g.* Fineschi *et al.* 2000), de mélanges de populations anciennement isolées, voire d'hybridations. Par exemple, le pommier, *Malus domestica* Borkh serait issu de la domestication de *M. sieversii* (Ledeb.) M. Roem. d'Asie centrale (Harrison & Harrison 2011). Cependant, des croisements avec des espèces indigènes d'Europe comme *M. sylvestris* (L.) Mill. ont été détectés, homogénéisant la diversité génétique du genre (Cornille *et al.* 2012). Un cas voisin se présente avec la féralité de l'olivier, *Olea europea* L., domestiqué à partir de populations d'oléastre et pouvant revenir à l'état sauvage et s'hybrider avec des populations naturelles (Besnard *et al.* 2001, 2002). La domestication comprend un long processus de sélection (choix des morphotypes), souvent d'hybridation, puis de dispersion de taxons agricoles ou horticoles, souvent polyploïdes.

Par ailleurs, les recherches actuelles en écologie montrent une homogénéisation de la biodiversité en milieux urbains, avec la substitution de taxons indigènes par une flore commune et mondiale (Schwartz *et al.* 2006). Si ce processus de remplacement ne diminue pas de façon drastique la richesse spécifique locale (diversité alpha), il peut fortement réduire la biodiversité globale (McKinney 2006). Enfin, maintes espèces échappant au contrôle humain ont colonisé les milieux naturels, ces invasives engendrent une homogénéisation planétaire de la biodiversité.

I.1.4. Inflation taxonomique

L'importante activité de description a souvent conduit à une inflation taxonomique, comme en témoigne la liste de synonymes liée en général à chaque espèce végétale. Dès l'origine, le fixisme des anciens s'est traduit pas autant d'espèces que de formes distinctes, allant même jusqu'aux fameux « Jordanons » (référence au botaniste A. Jordan ayant décrit 1685 espèces, ayant de nos jours tout au plus le rang de variétés). En fait, le premier problème réside dans le fait de prendre en compte le polymorphisme naturel d'une espèce, puis de dégager les réelles différences existant avec les espèces voisines. Il existe peu de groupes n'ayant pas subi des découpages abusifs, suivis de réunions diverses, puis de remaniements incessants (subsp. en espèce, et *vice versa*). Certains groupes, souvent apomictiques et polyploïdes, sont notoirement connus pour ce type d'abus : *Hieracium*, *Taraxacum*, *Rubus*, *Rosa*, *Alchemilla*, *Limonium*... Maints botanistes portent un intérêt tout particulier à certaines régions ou à des groupes attrayants (Pillon & Chase 2006), entraînant des révisions répétées et des descriptions parfois abusives de taxons. Ces préférences favorisent souvent les fleurs printanières colorées (*e.g. Tulipa*), au détriment des floraisons précoces ou tardives, et les fleurs discrètes comme les épillets de graminées.

Depuis la création des listes de protection (Olivier *et al.* 1995 ; Danton & Baffray 1995), le rang d'espèce, privilégié par les instances environnementales, a donné lieu à une nouvelle inflation taxonomique. Ceci permet l'ajout de taxons à aire restreinte dans ces listes d'espèces, en augmentant la biodiversité d'une région donnée. Il en va de même avec la localisation des hot-spots, basés sur la richesse spécifique, le taux d'endémiques et les menaces pesant sur ces taxons. On assiste à une concurrence, voire à un chauvinisme régional (insulaire notamment), pour accéder aux premières places de ces classements. A titre d'exemple, les deux « espèces-sœurs » *Astragalus tragacantha* L. du littoral Corso-Sarde et Ibéro-Provençal, et *A. sirinicus* Ten. des montagnes Corso-Sardes et de l'Apennin ont taxonomiquement disparu de ces deux îles, remplacées par six nouvelles espèces en 20 ans (l'une d'elles serait même déjà éteinte, l'endémique Sarde *A. thermensis* Vals. ; Valsecchi 1994 ; Bacchetta & Brullo 2006, 2010). Cette "taxonomie de la conservation" correspond avant tout à une stratégie de protection de populations géographiquement ou morphologiquement différenciées. Cependant, la taxonomie descriptive reste d'actualité, puisque des régions longtemps sous-étudiées figurent maintenant parmi les plus riches de

Méditerranée (notamment la Dalmatie : Griffiths *et al.* 2004 ; Hewitt 2011, et la Kabylie, Vela & Benhouhou 2007).

La domestication peut aussi être perçue comme génératrice d'espèces, puisque les génotypes sélectionnés présentent de nettes différences morphologiques légitimant un binôme distinct de celui des espèces sauvages apparentées. Les traitements taxonomiques sont assez hétérogènes, ainsi le pommier cultivé a acquis le rang d'espèce, *Malus domestica*, comme de nombreuses Solanaceae agricoles (Knapp *et al.* 2013), alors que l'olivier cultivé est considéré comme une variété, *Olea europea* subsp. *europea* var. *europea*. Si l'ambiguïté demeure pour les taxons interfertiles ayant le même nombre chromosomique, par contre dans les cas d'hybridations suivis de polyploïdie, le rang d'espèce nouvelle s'impose comme pour les Blés.

I.2. Vers une taxonomie intégrative

Dans la plupart des exemples d'interactions Homme-Biodiversité, la délimitation taxonomique joue un rôle prépondérant (Isaac *et al.* 2004 ; Padial & de La Riva 2006). Pour les populations impactées, connaître et estimer leurs effectifs permet de prévoir leur risque d'extinction (Mace 2004). Dans les cas d'homogénéisation de la biodiversité, la taxonomie constitue une base pour détecter les événements d'introduction et de croisements interspécifiques (description des parents et des hybrides ; Ainouche *et al.* 2004). Cette thèse s'inscrit dans un large cadre de la biologie évolutive et plus particulièrement dans celui de la systématique/taxonomie végétale (Encadré 1). Avant d'exposer notre modèle et nos résultats, il convient de décrire l'état actuel de ces disciplines. Réunir des individus sur la base de leurs ressemblances fut historiquement une des premières disciplines. Malgré son ancienneté et son évolution constante, cette discipline demeure subjective mais constitue toujours la première étape de toutes les études du vivant puisqu'elle permet de former des entités cohérentes pour les modèles biologiques. Cependant, elle s'inscrit aussi en aval de toutes recherches comme résultante intégrative décrivant au mieux le vivant sur la base des connaissances scientifiques disponibles. Nous aborderons ici l'état actuel de la discipline au regard de son histoire, ainsi que son intérêt et sa pratique à travers la notion clé d'espèce.

Encadré 1. De la taxonomie à la systématique.

Avant même de classer le vivant, nommer la discipline concernée est déjà matière à réflexion. Si ce questionnement paraît superficiel, il reste important pour l'accessibilité des travaux dans la communauté scientifique. Le terme 'taxonomie' a été initialement formulé par A.P. de Candolle (1813), le définissant comme "la théorie des classifications appliquée au règne végétale". La systématique est un terme aussi ancien attribué à Lindley (sous la forme 'systematic botany', 1830), mais faisant écho au *Systema naturae* de C. v. Linné. Si l'utilisation de ces deux termes est courante et souvent interchangeable depuis le XIX^{ème} siècle, Small (1989) note une plus grande présence du terme 'taxonomy' (42871 vs. 10064 pour 'systematics') sur la base de 12M de titres d'études entre 1943 et 1986. A titre de comparaison, cette balance semble s'être équilibrée d'après titres publiés depuis 1987 dans *Systematic Biology*, *Systematic Botany*, *TAXON* et *Plant Systematic and Evolution* (463 'taxonomy(-ic)' vs. 419 'systematic(s)'; Web of knowledge).

Il existe des différences notables entre ces deux termes. Elles se rapportent souvent aux définitions de G.G. Simpson (1961), décrivant la systématique comme "l'étude des types et diversités d'organismes et de leurs relations", et incluant la taxonomie, "étude théorique de la classification, comprenant ses bases, principes, procédures et lois". D'autres distinctions taxonomie/systématique décrivent un couple pratique/théorique, théorie/pratique ou discipline/résultat (Simpson 1951). Les travaux plus récents délimitent généralement la taxonomie à la description (nomenclature), la détermination (délimitation spécifique) et à la classification des taxons (Knapp *et al.* 2004). La systématique est souvent définie plus largement, associant des informations sur l'évolution des taxons. Une énième distinction plus actuelle décrit la taxonomie comme discipline délimitant, et la systématique comme classant. Au cours de cette thèse, nous considérerons la systématique comme une partie de la biologie évolutive concernant l'étude de la diversification des organismes et de leurs liens de parenté. Lui étant étroitement associé, la taxonomie sera perçue comme la description et la classification pratique du vivant sur la base d'un faisceau d'évidences scientifiques et d'un code de nomenclature (*e.g.* code international de nomenclature botanique, ICBN 2011).

I.2.1. Crise et renouveau de la taxonomie

La taxonomie évolue et s'améliore au fil du progrès scientifique par l'utilisation de nouvelles techniques ou d'avancées conceptuelles (Encadré 2). Dans un contexte de crise de la biodiversité, ces méthodes permettent l'accélération de la description du vivant, et notamment des entités à protéger en priorité (Callmander *et al.* 2005). Ces dernières années, plusieurs appels au barcoding ADN et à une taxonomie moléculaire ont été lancés ("A plea for DNA taxonomy", Tautz *et al.* 2003; "The promise of DNA barcoding for taxonomy", Hebert & Gregory 2005; "DNA barcoding and the renaissance of taxonomy", Miller 2007). Cette littérature parfois excessive (voire provocatrice, *e.g.* "DNA barcoding and the mediocrity of morphology", Packer *et al.* 2009) s'accompagne d'une remise en question de la taxonomie 'classique'. En effet, maints chercheurs lui reprochent sa lenteur, son manque de résolution et de rigueur, et ses descriptions arbitraires ou 'démodées' ("old-fashioned typological approach",

Dayrat 2005), comparés aux méthodes modernes de biologie moléculaire. Plusieurs articles regrettent le cloisonnement des spécialistes qui ne prennent pas en compte les interactions avec les disciplines connexes (*e.g.* génétique des populations, écologie, phylogéographie).

L'absence de financements pour la recherche en systématique est désignée à la fois comme le reflet du désintérêt scientifique pour la taxonomie (Ebach *et al.* 2011), mais aussi comme la conséquence d'un manque d'ouverture de la discipline (Godfray 2002). Enfin, la prépondérance des marqueurs moléculaires dans les revues bien cotées biaise le processus de publication et exacerbe les tensions (*e.g.* "Taxonomy and the mediocrity of DNA barcoding", Holynski 2010, en réponse à Packer *et al.* 2009). Si le barcoding moléculaire semble légitime en tant que composante de la « boîte à outils » taxonomique, cette méthode ne peut, à elle seule, distinguer les phénomènes de spéciation (*e.g.* hybridation, polyploïdisation, radiation évolutive récente ; *e.g.* Korotkova *et al.* 2011), ni rendre compte de la complexité d'une espèce. Alors que la taxonomie s'est enrichie de nombreuses méthodes depuis 250 ans, la réduire à l'étude d'un seul marqueur constituerait une évolution régressive ("single-character-system", Will *et al.* 2005). Pour atténuer ce conflit en partie 'générationnel', un appel à une taxonomie intégrative a été lancé par l'intermédiaire de certaines publications (Dayrat 2005). En effet, il existe au-delà des affrontements un point essentiel sur lequel les 'acteurs de l'espèce' s'accordent : la taxonomie doit privilégier la qualité à la quantité, et éviter les descriptions superflus générées de façon automatique par le barcoding moléculaire ou arbitraire par des botanistes peu scrupuleux (Carvalho *et al.* 2008). Cette refonte de la taxonomie est généralement définie comme une étape nécessaire pour l'évolution de la discipline ("Taxonomy needs evolution, not revolution", Knapp *et al.* 2002). Loin de rétrograder la morphologie à un second plan, cette mise à jour de la taxonomie vise à limiter la description d'espèces à celles supportées par un faisceau d'évidences biologiques (*e.g.* morphologiques, moléculaires, écologiques), suite à une révision taxonomique récente du groupe d'étude (synthèses sur les types, noms et synonymes). De plus, Dayrat (2005) recommande de ne pas se baser sur quelques échantillons ne reflétant pas les variations intra-/interspécifiques, et de ne plus décrire d'espèces sans avoir déposé dans un herbier agréé des spécimens sur lesquels des analyses moléculaires restent réalisables. La prise en compte des processus évolutifs représente aussi un enjeu important de la taxonomie intégrative, l'associant à la génétique des populations, à l'écologie moléculaire et à la phylogéographie, pour caractériser les processus de spéciation légitimant le statut d'espèce (Padial *et al.* 2010).

Encadré 2 : Evolution de la systématique, de l'*Historia Plantarum* au barcoding

La systématique a évolué suivant l'accélération du progrès scientifique. Cette discipline peut être compartimentée en six périodes successives mais scientifiquement additives, caractérisées par l'utilisation d'outils et de concepts variant au cours du temps (Stevens 1984, 2000 ; Constance 1964 ; Small 1989):

(i) Phase macromorphologique (400 BC – 1700 AD) : Les premières études de la biodiversité végétale remontent à l'Antiquité, en particulier avec les écrits de Théophraste (*Historia Plantarum*), puis Plin l'ancien et Dioscoride. Suite à des travaux fondamentaux (*e.g.* Cesalpino; Ray), les premières classifications végétales méthodiques sont attribuées à Morison et Magnol. Ce dernier initie le terme de 'familles', bien qu'elles restent des groupes polythétiques, *i.e.* non-soutenus par un ou plusieurs caractères nécessaires et suffisants pour les définir. Par son système de nomenclature binominale, Linné devient un des fondateurs de la taxonomie. Faisant suite à la classification de Tournefort, il propose une classification dite 'artificielle' (pratique) basée sur un seul groupe de caractères, les organes reproducteurs.

(ii) Phase micromorphologique (1700 – 1860) : Période clé du progrès scientifique, le XVIII^{ème} siècle voit l'essor de la biologie végétale (*e.g.* pollinisation, photosynthèse). L'invention du microscope permet un progrès technique dans l'observation des plantes. Critiquant la classification artificielle de Linné, Adanson propose la première classification dite 'naturelle' (prémices évolutionnistes), reposant sur 65 caractères analysés rigoureusement et sans *a priori*. La pondération des caractères devient un progrès méthodologique crucial en systématique, par les travaux de Jussieu, Lamarck, puis de Candolle. Avec la géographie botanique, les naturalistes (*e.g.* Humboldt, Willdenow, Jacquemont, Desfontaines) voyagent et ramènent en Europe de nombreux 'chaînon manquant' pour l'établissement de classifications plus complètes.

(iii) Phase évolutionniste (1860 - 1910) : La publication des théories de l'évolution principalement synthétisé et conceptualisé par Darwin et Wallace permet des progrès considérables dans la perception évolutive de la systématique. Les notions d'évolution permettent de théoriser les relations phylogénétiques entre les taxons et de mieux interpréter les classifications naturelles, bien que les méthodes de classification varient peu en pratique. L'étude des plantes fossiles, les progrès en physiologie et cytologie végétale, ainsi que les premières considérations en écologie et en génétique permettent de grandes avancées théoriques. En plus des classifications complètes de Engler, Hooker et Bentham, paraissent des travaux de systématique plus précis se focalisant sur certains groupes taxonomiques (*e.g.* les Ptéridophytes ; Hooker 1864).

(iv) Phase cytogénétique (1910 – 1960) : La systématique incorpore les méthodes et concepts en génétique des populations (Mendel, De Vries) et en cytogénétique. Ces disciplines permettent des avancées fondamentales dans la théorie gène-chromosome de l'hérédité, ainsi que l'intégration de marqueurs génétiques en systématique. Prises en compte par l'étude des nombres chromosomiques, la polyploïdie et l'hybridation révèlent leur rôle majeur dans l'évolution des plantes (Stebbins, Favarger, Contandriopoulos). Cette période est marquée par le concept d'espèce biologique (Mayr 1942). En parallèle, de nouvelles méthodes (électrophorèse, extraction ADN) se développent sans être encore appliquées à la systématique.

(v) Phase biosystématique (1960 – 1990) : La littérature de cette période décrit un renouveau de la systématique. La biosystématique devient une science de synthèse entre de nombreuses disciplines, dominée par les concepts de génétique et d'évolution. D'abord dominante, la cytogénétique est progressivement reléguée par des avancées biochimiques (protéines, enzymes, acides nucléiques) permettant l'étude de variations spécifiques à populationnelles. Les classifications sont méthodologiquement bouleversées par les phylogénies cladistiques (Henning ; Wagner) et phénétiques. La notion d'espèce phylogénétique devient prépondérante. L'écologie permet de mieux comprendre la plasticité phénotypique des taxons.

(vi) Phase moléculaire (1990 – ...) : l'application en routine des techniques de biologie moléculaire (PCR, séquençage, empreintes multilocus), permet la prolifération des phylogénies moléculaires, supportées par des nouvelles méthodes analytiques (*e.g.* probabilistes). La systématique et la notion de taxon deviennent des outils pratiques pour l'étude organisée de la biodiversité. La génétique des populations et la phylogéographie deviennent des disciplines connexes à la taxonomie inter- et intra-spécifique. L'acquisition exponentielle de séquences ADN et leur application en taxonomie permettent à certains généticiens l'amorce d'une taxonomie moléculaire (barcoding ADN) contournant la démarche synthétique 'classique'. Depuis quelques années, les méthodes de séquençage haut-débit (NGS) permettent des études génomiques poussées.

Les taxonomistes doivent trouver des contextes favorables à leur expertise, avoir une utilité plus directe aux autres disciplines pour être mieux financés, et donc augmenter la qualité de leurs travaux (Godfray & Knapp 2004 ; Gotelli 2004). Un exemple est donné avec les travaux de systématique sur l'évolution des Solanaceae proches d'espèces cultivées telles que la tomate, la pomme de terre ou le tabac (Knapp *et al.* 2002, 2013). Cette démarche 'opportuniste' permet la réalisation de grandes missions d'échantillonnage dans des régions peu explorées, la découverte de plusieurs espèces, mais aussi l'étude de divergences génomiques constituant à la fois un support pour la taxonomie et des perspectives pour l'agronomie (Zouine *et al.* 2012). En résumé, la taxonomie intégrative décrit une approche méthodologiquement plus diversifiée mais rigoureuse, plus productive mais parcimonieuse, moins descriptive mais explicative, utilisant judicieusement les marqueurs les plus efficaces à la ségrégation des taxons et s'intégrant aux avancées de la recherche scientifique.

Cependant, si l'évolution de la taxonomie au fil des progrès scientifiques semble de toute évidence nécessaire, l'importante littérature l'encourageant peut parfois paraître désuète ("Integrative taxonomy then and now", Valdecasas *et al.* 2008). Cette refonte de la discipline rappelle l'engouement passé pour la biosystématique valorisant l'ouverture à différents outils et disciplines ('The new systematics', Huxley 1940 ; Stevens 2000). En fait, une notion capitale est sous-tendue dans toutes ces discussions, mais rarement abordée de front : celle du concept de l'espèce qui reste toujours aussi intuitif et/ou subjectif.

I.2.2. La notion d'espèce

« No one definition has satisfied all naturalists; yet every naturalist knows vaguely what he means when he speaks of a species » Darwin 1859: *On the origin of species*.

La notion d'espèce demeure une des plus grandes interrogations scientifiques, reflétant la relation ancienne et intriquée entre l'étude du vivant et la perception humaine. Il s'agit d'un réel paradoxe, puisque scientifiquement contestable et cependant fondamental en Recherche. En effet, l'utilisation de ce concept se situe à la base des disciplines du vivant, permettant la définition d'un cadre biologique cohérent pour les investigations scientifiques. Dans un cadre législatif, l'espèce représente aussi l'unité de référence pour la réalisation des listes de protection nationales ou régionales (Danton & Baffray 1995 ; Olivier *et al.* 1995). Ainsi, la

taxonomie et la conservation couvrent des champs assez proches, et leur pratique confondue peut amener d'importants biais systématiques (Cf. I.3.3. Inflation taxonomique, 'taxonomie de la conservation'). D'ailleurs, les évaluations de biodiversité et la localisation des hotspots, conduisant à des mesures de conservation prioritaire à l'échelle mondiale, reposent toujours sur des recensements d'espèces (Peterson & Navarro-Siguenza 1999 ; Isaac *et al.* 2004).

Si plusieurs définitions de l'espèce ont été proposées (synthèses dans Sluys & Hazevoet 1999 ; Queiroz 2007), elles peuvent être réunies dans deux grands concepts aux implications méthodologiques et analytiques distinctes (Figure 1) : l'espèce biologique et l'espèce phylogénétique ("tree-based methods"). La première repose sur l'isolement reproductif inter-spécifique (*i.e.* hybrides stériles): "groups of actually or potentially interbreeding natural populations, which are reproductively isolated from other such groups" (Mayr 1942). Or, chez les végétaux, les nombreuses expériences de croisements ont souvent fourni des résultats surprenants, tout d'abord par l'existence insoupçonnée d'innombrables groupes autogames ou apomictiques *s. l.* De plus, si ce concept s'applique sans problème aux espèces diploïdes sympatriques et allogames, par contre les taxons ayant très peu de chance de se croiser *in situ* (différences d'aire, d'écologie, de période de floraison, de pollinisateurs...) peuvent souvent s'hybrider, suite à l'absence des barrières génétiques d'isolement. Ceci s'applique probablement aux fréquentes hybridations interspécifiques des *Quercus* (*e.g.* Ortego & Bonal 2010) et maints ligneux, diploïdes à aires initialement allopatriques, mais souvent devenus sympatriques par l'anthropisation. En outre, ces barrières d'isolement étant en général perdues chez les polyploïdes, leurs croisements s'avèrent presque toujours fructueux et conduisent à des groupes de fusion, comme chez les *Knautia* (Verlaque 1985) ou les *Dactylis* ; Lumaret & Borrill 1988).

Cependant, il existe de nombreuses méthodes pour évaluer les flux de gènes intra- et inter-spécifiques par des estimations indirectes de l'isolement reproducteur, afin d'évaluer les variabilités intra- et inter-groupes. Précisons que les marqueurs génétiques *s.l.* transmissibles comprennent les données moléculaires, morphologiques et cytogénétiques notamment. Un problème se rencontre chez les espèces clonales puisque l'isolement reproducteur domine à l'échelle intra-spécifique. La notion d'espèce phylogénétique (ou cladistique) s'inscrit dans l'histoire des lignées et l'évolution des caractères transmis, limitée à un groupe d'organismes partageant un caractère dérivé ou un ancêtre commun (lignée monophylétique ; Queiroz &

Donoghue 1990 ; Davis & Nixon 1992). Cette notion est actuellement très utilisée, puisqu'en théorie un seul arbre phylogénétique suffirait à résoudre la taxonomie d'un groupe d'espèces. Cependant, l'hybridation n'est pas prise en compte dans ce système dichotomique. De plus, ces méthodes basées sur des phylogénies de gènes reflètent plus l'histoire même du gène que la différenciation des lignées. Enfin, cette notion a tendance à augmenter le nombre d'espèces, les rendant géographiquement plus restreintes et comprenant moins de populations, d'où un impact direct sur la conservation de la biodiversité (Agapow *et al.* 2004).

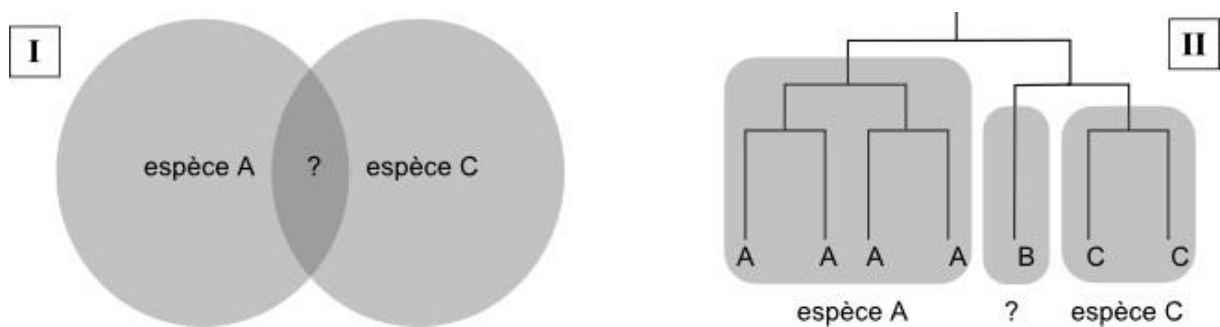


Figure 1. Schémas des deux principaux concepts d'espèce et de leurs limites. I, deux espèces biologiques avec une zone d'hybridations possibles. II, deux espèces phylogénétiques ayant chacune un phénotype, et une lignée isolée présentant un phénotype A mais des affinités phylogénétiques avec l'espèce C.

Dans leur synthèse sur les diverses méthodes récentes de délimitation d'espèces, Sites et Marshall (2003, 2005) concluent qu'aucun marqueur ni algorithme ne définira à lui seul la diversité des cas de légitimité du rang spécifique. Malgré les éclaircissements théoriques, la notion d'espèce reste subjective en pratique. Rejoignant le débat sur la taxonomie intégrative, certains auteurs ont proposé des définitions synthétiques ('general lineage concept', Queiroz 1998 ; 'evolutionary species concept', Wiley & Mayden 2000). Dans son 'unified species concept', Queiroz (2007) divise la définition de l'espèce en deux étapes : (i) la conceptualisation qui sous-entend une lignée différenciée de métapopulations (où lignée = série ancêtre-descendant : Simpson 1961 ; et métapopulation = sous-populations connectées : Levins 1970 ; Hanski & Gaggiotti 2004) ; (ii) la délimitation qui inclut plusieurs méthodes équivalentes dont la convergence renforce le statut spécifique.

Par ailleurs, l'oubli de la caryologie dans les débats modernes reste regrettable, puisque souvent crucial dans la notion d'espèce. En effet, ses champs d'application sont très vastes et toujours actuels, grâce aux données acquises depuis 60 ans. Les changements chromosomiques constituent une des caractéristiques du monde végétal, tant au niveau des nombres ($2n = 4$ à 1320) que par la morphologie des chromosomes. Les variations numériques sont de trois ordres : dysploïdie (changement du nombre de base des diploïdes), aneuploïdie (perte ou gain de chromosomes chez les polyploïdes) et polyploïdie (multiplication du nombre de génomes) qui concerne 50 à 60% des Angiospermes. Il s'agit de processus fondamentaux de différenciation et de spéciation qui induisent presque toujours des barrières immédiates d'isolement entre les divers cytotypes. Sur le plan taxonomique, conjointement à d'autres disciplines, ces variations chromosomiques ont largement contribué à améliorer les classifications, à tous les rangs hiérarchiques. Le nombre chromosomique, le niveau de ploïdie, le caryotype et la quantité d'ADN correspondent à des critères majeurs d'identification, au même titre que les autres caractères utilisés en biosystématique. Sur le plan évolutif, la mise en évidence et la compréhension de ces variations a permis de mieux cerner l'origine et l'histoire de certains groupes, notamment la diversité d'âge des endémiques.

I.3. Modèle d'étude

I.3.1. Genèse du sujet : Conservation d'*Arundo plinii s.l.* à Fréjus

Si cette thèse porte sur la presque totalité du genre *Arundo* L. (Poaceae), impliquant différentes disciplines liées à la systématique et l'évolution, ces travaux trouvent leur origine dans la problématique de conservation d'une espèce rare et menacée sur le territoire français, la canne de Pline, *Arundo plinii* Turra *sensu lato*. En effet, ce taxon est doublement protégé à l'échelle régionale, *i.e.* en Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) et en Languedoc-Roussillon, il figure également sur la liste prioritaire des plantes menacées (Olivier *et al.* 1995) maintenant classée parmi les espèces vulnérables par l'IUCN. Or, *A. plinii s.l.* se rencontre essentiellement à Fréjus (Var), station balnéaire du Sud-Est de la France en pleine expansion. Diffuse au sein du tissu urbain, sa répartition freine de nombreux travaux et attise les tensions entre 'naturalistes' et 'aménagement'. A titre d'exemple, *A. plinii* bloquait en 2008 au moins dix chantiers d'aménagement urbains (Walicki 2008). La communauté d'agglomération de Fréjus-

Saint-Raphaël sollicite donc la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL) et le Conseil National de la Protection de la Nature (CNPN) en 2008 pour obtenir des dérogations de transplantation/destruction de certaines populations.

La première opération concernait la réhabilitation d'un quartier sensible de reclassement, La Gabelle, accompagnée d'une proposition d'un plan de conservation visant à transplanter une très petite partie du peuplement dans un bassin de rétention au Castellàs, à quelques kilomètres. En 2009, la DREAL et le CNPN ayant pris connaissance de la révision taxonomique d'*A. plinii s. l.* par Danin (2004) jugèrent que les connaissances scientifiques étaient totalement insuffisantes pour valider le plan de conservation proposé par la ville. De nombreux doutes existaient, notamment au niveau du statut taxonomique des populations présentes en France. En effet, Danin les réunissait seulement avec celles de Bologne au sein d'une espèce endémique très localisée, alors que la ville traitait d'une plante circum-méditerranéenne assez commune. Or, les délimitations taxonomiques et géographiques jouent un rôle primordial pour statuer sur la réelle rareté d'un taxon, des facteurs de menaces, et établir un plan de conservation concerté.

Cette thèse a donc été entreprise pour acquérir ces connaissances élémentaires (*e.g.* morphologie, reproduction, écologie, caryologie, biologie évolutive), elles se révélèrent d'autant plus utiles que les premières transplantations se soldèrent par un échec.

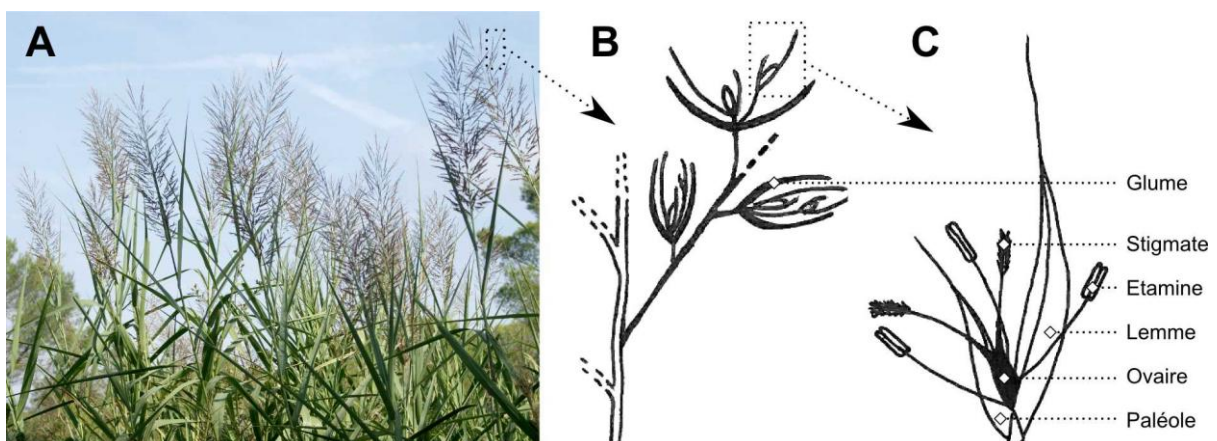
I.3.2. Taxonomie du genre *Arundo*

Le genre *Arundo* L. regroupe des graminées robustes connues sous le nom vernaculaire de cannes ou par abus de langage 'roseaux' (qui correspondent au genre voisin *Phragmites*). Les *Arundo* présentent des caractéristiques rares chez les Poaceae d'Europe, comme la hauteur (1-6 m), la rigidité des tiges et la floraison automnale, qui constituent autant de convergences évolutives rares avec la sous-famille des Bambusoideae. Ce port robuste est responsable de multiples confusions et d'une lourde synonymie, puisque environ 238 taxons ont été décrits, souvent à tort, dans le genre *Arundo* (Govaerts 1999). Au début des années 2000, ce genre ne comptait plus que trois espèces : (i) l'endémique Taïwanaise *A. formosana* Hack., (ii) l'eurasienne sub-tropicale *A. donax* L. et (iii) la circum-méditerranéenne *A. plinii* Turra. Ainsi, les *Arundo* possèdent une distribution native Sud-Eurasiatique, sous le bioclimat sub-tropical humide et méditerranéen. Cependant, la taxonomie du genre resta longtemps à ce stade par manque d'intérêt des botanistes pour ces graminées communes et rudérales. Or depuis 10 ans,

les études initiées par Pr. Avinoam Danin ont mis en évidence l'important polymorphisme d'*A. plinii* (Danin *et al.* 2002 ; Danin 2004), puis d'*A. donax* en Asie (Mariani *et al.* 2010). Ayant le mérite de révéler la méconnaissance des *Arundo*, ces travaux préliminaires nécessitaient de nouvelles recherches plus approfondies. Nos travaux de systématique et d'évolution s'inscrivent dans ce contexte.

I.3.3. Morphologie et écologie du genre *Arundo*

Morphologie. Toutes les espèces de ce genre se composent d'une partie aérienne, les chaumes (Figure 2), et d'une partie souterraine, les rhizomes, qui assure la croissance principale et classe les *Arundo* parmi les géophytes (Raunkiaer 1934). Les bourgeons souterrains peuvent former des axes rhizomateux supplémentaires à croissance horizontale, ou se différencier en chaume par croissance verticale. Chez les *Arundo*, située à l'extrémité du chaume, l'inflorescence se compose d'environ un millier d'épillets organisés en panicule. Le chaume pérenne se forme généralement en une année, mais sa rigidité lui permet de persister durant l'hiver et de se ramifier aux nœuds la seconde année, voire parfois de fleurir aussi sur des axes secondaires (caractère de Phanérophyte) en général sur les taxons décombants d'Asie. La floraison de tous les *Arundo* est automnale, contrairement à la presque totalité des graminées de Méditerranée (*Phragmites* exceptés). Comme chez les autres Poaceae pérennes, le pollen est anémophile (Richards 1997). De même, le vent assure la dispersion des diaspores : le caryopse restant enfermé entre la lemme ciliée indurée et la paléole (Figure 2).



Clonalité. L'anémophilie et l'anémochorie impliquent des dispersions de pollen et de diaspores par le vent sur de grandes distances. Cependant, chez *A. donax* invasif les sérieux problèmes de stérilité mis en évidence (Johnson *et al.* 2006) semblent associés à sa stratégie de propagation par multiplication végétative. Si la forte clonalité du genre laisse présager d'une faible diversité génétique intra-spécifique, elle rend aussi impossible la prise en compte d'une structure populationnelle. En effet, la formation de taches monospécifiques, parfois sur plusieurs centaines de mètres carrés, ne permet pas de distinguer les individus entre eux, si ce n'est au niveau souterrain (Figure 3). Seules deux études antérieures ont utilisé des marqueurs moléculaires sur *Arundo* pour tester la diversité génétique d'*A. donax*, espèce envahissante aux USA (Khudamrongsawat *et al.* 2004 ; Ahmad *et al.* 2008). Ahmad *et al.* (2008) ne sont pas parvenus à mettre en évidence de variabilité génétique sur 185 taches d'*A. donax* réparties dans tout le Sud des Etats-Unis, malgré l'emploi de marqueurs multilocus à haute résolution ('Sequence Related Amplification Polymorphism' et éléments transposables). Ces résultats confirment donc la très forte clonalité de ce taxon et sans doute des *Arundo* en général.



Figure 3. Rhizomes d'*A. donax* (A) et d'*A. plinii s.l.* (B). Echelle = 4 cm (photographies réalisées à la même échelle)

Ecologie. Au-delà des connaissances basiques sur le genre *Arundo*, les études menées sur la physiologie et l'écologie de ce groupe concernent presque exclusivement *A. donax*. Sur les 211 titres d'articles contenant le mot *Arundo* dans Web of Knowledge, 198 portent sur *A. donax*, 4 sur *A. formosana*, le reste correspondant à des liens fortuits ou à d'autres genres. La plupart de ces publications concernent l'utilisation d'*A. donax* comme combustible, biocarburant ou phyto-épurateur. De plus, en tant qu'espèce envahissante dans la plupart des terres chaudes du globe, ce taxon fait aussi l'objet de recherches en écologie afin de limiter les conséquences de son invasion (Going & Dudley 2007 ; Lewandowski *et al.* 2003). De cette importante littérature se dégagent de nombreuses informations physiologiques et écologiques.

Dans ces régions, *A. donax* envahit de préférence les berges de cours d'eau, permettant la dispersion des propagules en aval (Else 1996). Boose & Holt (1999) démontrent que 90% des fragments de tiges et de rhizomes, porteurs d'au moins un bourgeon, reprennent. Wijte *et al.* (2005) soulignent de fortes variations saisonnières des taux de reprise, élevés en été (90-100%) et faibles en hiver (0-20%). Les *Arundo* possédant la capacité de produire un bourgeon et des racines à chaque nœud, cette multiplication végétative leur confère un puissant potentiel colonisateur en ripisylve, en particulier durant les crues. De plus, *A. donax* s'établit de préférence sur des sols nus et fortement humides, comme ceux des bords de parcelles agricoles ou de ripisylves (Quinn & Holt 2008). Cette canne montre un net penchant pour les sols riches en nitrates sur lesquels la formation de jeunes pousses a lieu toute l'année, alors que sur sols maigres, la repousse se réalise seulement durant le printemps et l'été (Decruyenaere & Holt 2005). Ainsi, la préférence d'*A. donax* pour les milieux humides et rudéraux, et sa forte capacité de reprise après perturbations correspondent aux caractéristiques d'une espèce rudérale (Grime 1977).

Comme tous les *Arundo*, la canne de Provence forme des peuplements denses et quasi-monospécifiques, l'espacement faible et régulier des chaumes évite la compétition intra-individuelle pour les ressources hydrocarbonées et la lumière (Decruyenaere & Holt 2005). Les rhizomes jouent aussi un rôle de réserve en carbohydrates (Quinn & Holt 2008). La hauteur (jusqu'à 6 m), la croissance verticale rapide ('jusqu'à 10 cm par jour' ; Perdue 1958 ; Going & Dudley 2007), la densité des tiges et la persistance souterraine font d'*A. donax* une espèce très compétitive (Grime 1977). De plus, cette espèce invasive a un impact négatif sur les autres compartiments de l'écosystème, sur les espèces voisines (Bell 1998) et sur la diversité en arthropodes (Herrera & Dudley 2003).

A l'image d'*A. donax*, les autres espèces du genre occupent souvent des milieux rudéraux, tels que les ripisylves, les terres agricoles et les friches. Bien qu'ayant besoin d'une humidité du sol importante, les cannes ne peuvent pas survivre dans des sols en permanence engorgés, au contraire des *Phragmites* (les vrais roseaux). Cette différence provient de la présence d'une assise aëriifère dans les rhizomes et le bas des chaumes de *Phragmites*, absente chez les *Arundo* (Danin & Naenny 2008). En ripisylve, les *Arundo* se placent toujours derrière les roseaux et sur la terre ferme. Notons cependant qu'*A. donax* peut supporter un certain

degré de sécheresse expliquant son omniprésence dans le paysage méditerranéen. Cette position privilégiée dans l'agriculture méditerranéenne constitue un héritage de ses multiples utilisations depuis l'Antiquité jusqu'à nos jours (Perdue 1958).

I.3.4. Objectifs de la thèse

Inscrite dans le cadre des interactions Homme/Biodiversité en Méditerranée, cette thèse se focalise sur un genre taxonomiquement méconnu dont l'utilisation remonte pourtant à l'Antiquité, voire la Préhistoire. Elle concerne initialement des populations, rattachées à *A. plinii s. l.*, très menacées par les activités anthropiques d'une ville touristique en expansion. L'ignorance totale des caractéristiques (écologie, taxonomie, distribution, génétique) du taxon présent à Fréjus limite la mise en place de mesures de conservation appropriées. Dans ce contexte, nos travaux visent à améliorer les connaissances scientifiques relatives au genre *Arundo* en Méditerranée. Pour cela, la présente thèse se divise en quatre parties :

(i) La révision taxonomique des *Arundo* méditerranéens

Basé sur un large échantillonnage d'*A. plinii s.l.* réalisé en Méditerranée, ce travail a visé à éclaircir la taxonomie de ce complexe, et plus précisément à déterminer le statut taxonomique des populations menacées sur le littoral français. Pour cela, l'étude a pris en compte les traits biologiques influant sur l'évolution et la différenciation de ce genre. En plus des caractères morphologiques classiquement utilisés en taxonomie et permettant l'identification pratique des espèces, des marqueurs phylogénétiques à hautes résolutions tels que les empreintes AFLP, ainsi que des critères cytogénétiques relatifs à la différenciation des polyploïdes, ont permis de distinguer les différents taxons, malgré la clonalité dominante dans le genre.

(ii) L'origine d'*Arundo donaciformis* et la phylogéographie d'*A. plinii s. s.*

Les données et analyses en cyto- (nombres chromosomiques) et phylogénétiques (AFLP et ADNcp) ont été réalisées afin de mieux comprendre la différenciation d'*A. donaciformis* à partir de son espèce-sœur, *A. plinii s.s.* Les rôles de la polyploïdie et des variations climatiques du Quaternaire ont été recherchés au sein du complexe, notamment les principaux moteurs pour la spéciation de l'endémique ligurienne. Renseignant sur les processus évolutifs mis

en jeu dans une telle spéciation, ces données renforcent le statut taxonomique d'*A. donaciformis*. De plus, cette partie apporte des résultats en phylogéographie comparée des péninsules Italienne et Balkanique, avec des patrons de persistance différents pour chacune d'elle.

(iii) Conservation d'*Arundo donaciformis* à Fréjus

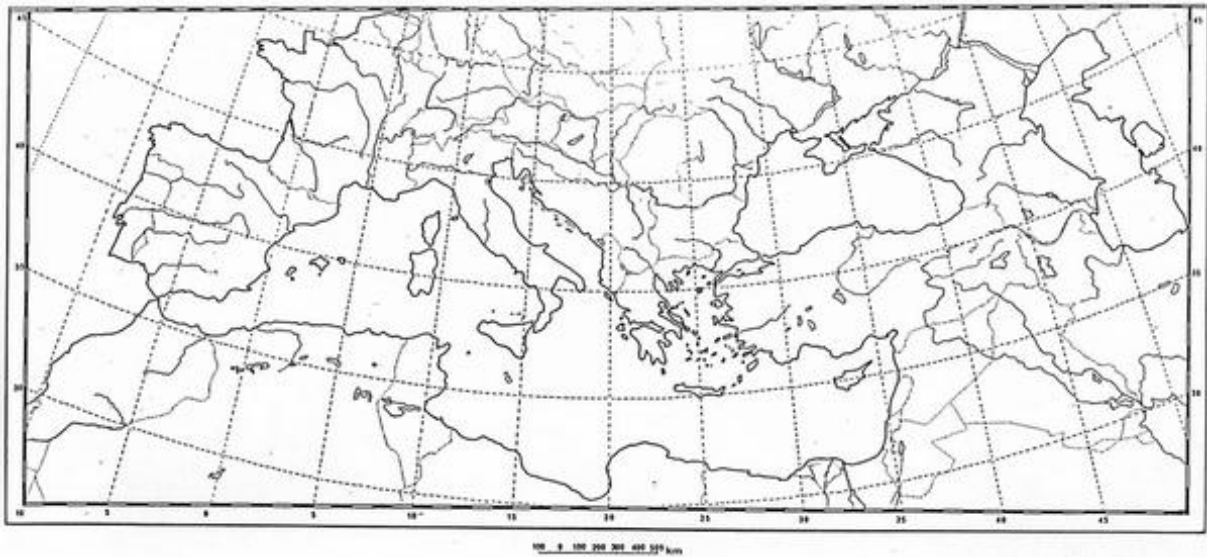
Se focalisant sur l'endémique Ligure, cette partie cherche à optimiser la conservation des populations de Fréjus fortement menacées par l'urbanisation. Dans ce contexte, nous avons mis en place une étude pluridisciplinaire mêlant sciences naturelles (génétique des populations, écologie) et humaines (géographie, sociologie), afin de définir un cadre scientifique à la conservation de cette espèce. Les nombreux paradoxes soulevés par la pluridisciplinarité posent la question de la conservation de la biodiversité native en milieu urbain.

(iv) Origine des clones méditerranéens et systématique des *Arundo* en Asie

Se basant sur les résultats génétiques issus de la première partie et décrivant l'uniformité génétique de deux espèces d'*Arundo* en Méditerranée (*i.e.* *A. donax* et *A. micrantha*), cette dernière partie de la thèse teste l'hypothèse de leur introduction ancienne dans ce Bassin. Pour cela, cette étude a utilisé des marqueurs morphologiques et phylogénétiques (mini- et microsatellites ADNcp), mais aussi indirectement cytogénétiques et écologiques.

Enfin, la discussion tentera d'illustrer la diversité des interactions Homme-Biodiversité en Méditerranée à la lumière des résultats obtenus chez les *Arundo*. Les rôles majeurs de la clonalité et de la polyploïdie dans la diversification de ce genre seront aussi mis en relation, ainsi que leur prise en compte en taxonomie. Enfin, différentes perspectives systématiques concernant l'origine et l'évolution du genre *Arundo* (notamment en Asie) seront proposées.

II. Systématique du genre *Arundo* en Méditerranée



Synthèse et perspectives

Annexes :

- **Manuscrit A** : Hardion *et al.* 2012. Nomenclature *Arundo. micrantha. Candollea*
- **Manuscrit B** : Hardion *et al.* 2011. In Marhold (Ed.). Chromosome data 11. *TAXON*
- **Manuscrit C** : Hardion *et al.* 2012. Systematics of *Arundo*. *TAXON*

II. Systématique du genre *Arundo* en Méditerranée

Les confusions taxonomiques et nomenclaturales au sein des *Arundo* en Méditerranée portent sur le complexe d'*A. plinii s.l.* et les entités qui le constituent. En 1765, Antonio Turra (1730-1796) décrit l'espèce dans la revue *Farsetia* sur du matériel de Bologne, et la dédie à Pline l'Ancien qui avait vanté les qualités de ces mêmes populations pour la confection des fûts de flèches. Puis, dans sa *Flora Italicae Prodrromus* (1780), Turra confirme la localisation d'*A. plinii* autour du "*Rheni Bononiensis*", soit le fleuve du Reno dans la région de Bologne (Emilie-Romagne). Conservé au muséum de Vicence (Vénétie, Italie), le type a disparu avec la destruction des collections lors de la seconde guerre mondiale et aucun spécimen d'*Arundo* ne figure dans le matériel de Turra déposé à la Société Linnéenne de Londres (LINN ; Stafleu & Cowan 1986).

En 1798, René Desfontaines (1750-1833) fait paraître sa *Flora Atlantica*, dans ce rapport naturaliste relatant ses deux ans de prospections en Afrique du Nord, il décrit *Arundo mauritanica* Desf. ainsi que 300 nouveaux taxons. Cependant, Jean-Louis-Marie Poiret (1755-1834) avait déjà publié ce même binôme en 1785, rendant celui de Desfontaines illégitime (selon l'article 53.1 du code international de nomenclature botanique). Or, l'*A. mauritanica* de Poiret correspond en fait à *Ampelodesmos mauritanicus* (Poir.) Durand & Schinz, alors que celui de Desfontaines est bien un *Arundo*. Par ailleurs, dans l'*Encyclopédie méthodique Botanique* (coécrite avec Poiret), Jean-Baptiste de Lamarck (1744-1829) avait décrit en 1791, à partir d'échantillons d'herbier donnés par son ami Desfontaines, un *Arundo micrantha* Lam. (antérieur donc prioritaire). En fait, on retrouve dans plusieurs herbiers et dans les flores postérieures le binôme *A. mauritanica* Desf., en tant qu'espèce (Bonnier & Douin 1911-1935) ou en synonymie d'*A. plinii s. l.* (Coste 1906 ; Fournier 1947), mais presque jamais celui d'*A. micrantha* Lam. Ces taxons ont été décrit plus petits qu'*A. donax* en toutes parties (Figure 4).



Figure 4. Types des principaux taxons méditerranéens décrits dans genre *Arundo*. **a**, *A. plinii* Turra (Lectotype, MARS) ; **b**, *A. micrantha* Lam. (Holotype, P-LAM) ; **c**, *A. collina* Ten. (Lectotype, MARS) ; **d**, *A. mauritanica* Desf. (Holotype, P) ; **e**, *A. mediterranea* Danin (Syntype, MARS) ; **f**, *A. donaciformis* (Loisel.) Hardion *et al.* (Isotype, MARS).

II. Systématique du genre *Arundo* en Méditerranée

C'est seulement en 2002 qu'A. Danin relance les travaux de taxonomie sur les *Arundo* méditerranéens, avec la description d'*A. hellenica* Danin, Raus & H. Scholz. Pour ces auteurs, cette petite canne grecque diffère d'*A. plinii s.l.* du Proche-Orient par sa plus petite taille, la configuration de ses lemnes et son écologie. Or, Danin se rend compte deux ans plus tard de la présence de ce même taxon en Italie, où Tenore avait déjà décrit *A. collina* Ten. en 1822 (*locus classicus* : Naples). Danin réalise donc une nouvelle étude taxonomique sur une trentaine d'individus, en utilisant des critères morphologiques et écologiques qualitatifs. Il divise ainsi ce complexe en trois taxons (Figure 5) : (i) *A. plinii sensu stricto*, restreint à Bologne (Emilie-Romagne, Italie) et à Fréjus (PACA, France) ; (ii) *A. collina* (synonyme prioritaire d'*A. hellenica*) la petite canne italo-grecque ; et (iii) *A. mediterranea* Danin, décrite comme une espèce plus robuste et ramifiée surtout présente au Proche-Orient et au Maghreb. Danin justifiait son nouveau binôme par la nécessité de remplacer le nom illégitime d'*A. mauritanica* et de réhabiliter l'espèce, mais il ignorait l'antériorité du nom *A. micrantha* Lam. (Cf. art. 11.1 de l'ICBN ; McNeil et al. 2006). Conscient des problèmes soulevés par son travail 'délibérément préliminaire', l'auteur lance un appel à la contribution de botanistes méditerranéens pour résoudre au mieux ce flou taxonomique.

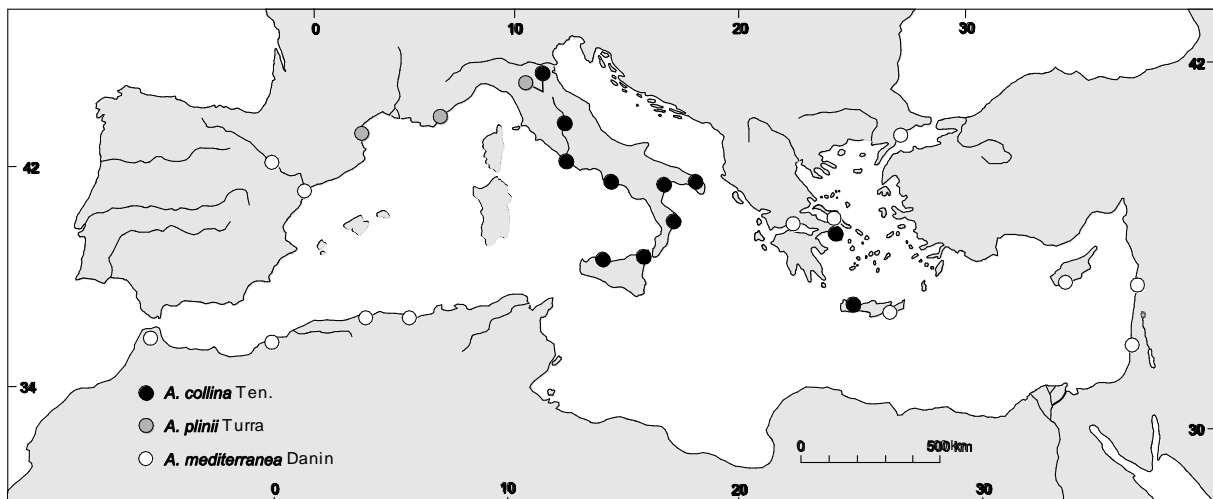


Figure 5. Distribution géographique des taxons issus de la révision préliminaire d'*A. plinii s.l.* en Méditerranée, d'après Danin (2004).

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris les premiers travaux de cytogénétique sur un échantillonnage restreint à sept régions d'occurrence d'*A. plinii s.l.* en divers points du bassin Méditerranéen. Nos dénombrements chromosomiques se sont ajoutés aux deux seules références antérieures pour *A. plinii s.l.*, indiquant chacune $2n = 72$ à Coimbra (Portugal ;

II. Systématique du genre *Arundo* en Méditerranée

Fernandes & Queiros 1962) et à Naples (Italie ; Pizzolongho 1962). Bien que préliminaires, nos résultats ont mis en évidence une variabilité caryologique inédite, avec la découverte de deux cytotypes nouveaux (Figure 6). Seulement à Tipasa, Tizi-Ouzou (Algérie) et Kolimpari (Crète), nous confirmons le nombre déjà connu pour « l'espèce », *i.e.* $2n = 72$. Par contre, les stations françaises montrent une grande originalité, avec les premiers hauts polyploïdes à $2n = 108$ découverts dans ce complexe. De plus, les quatre stations comptées à Bologne présentent toutes le même cytotype aneuploïde nouveau, *i.e.* $2n = 76$, retrouvé aussi à Volterra (Toscane, Italie). Ces quelques dénombrements ne concordent pas du tout avec les taxons délimités par Danin, notamment son *A. plinii* restreint à Bologne ($2n = 76$) et à Fréjus ($2n = 108$). En fait, l'inadéquation entre la distribution de ces cytotypes et le découpage proposé par Danin remet toute la systématique des *Arundo* méditerranéens en question. En plus de révéler pour la première fois la variabilité chromosomique de ce complexe, ces nouveaux comptages mettent en évidence des phénomènes de polyploïdie et d'aneuploïdie chez les *Arundo*.

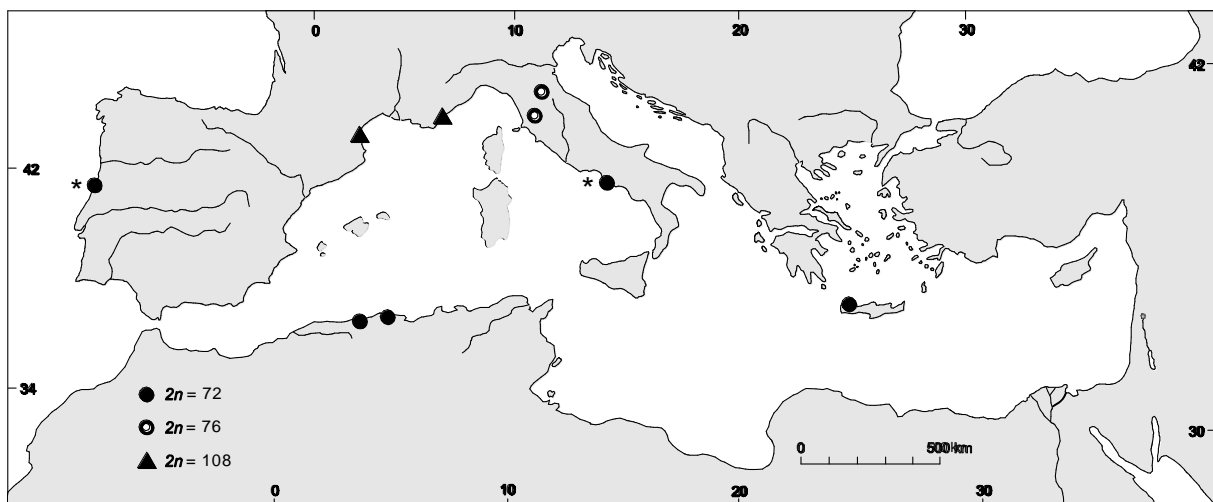


Figure 6. Distribution géographique exhaustive des cytotypes connus d'*Arundo plinii s.l.* en 2011 (Hardion *et al.* 2011). * Comptages à $2n = 72$ issus de la bibliographie (Fernandes & Queiros 1962 ; Pizzolongho 1962).

Révision systématique des *Arundo* Méditerranéens.

Afin de redéfinir les délimitations taxonomiques au sein d'*A. plinii s.l.* à travers le bassin méditerranéen, nous avons réalisé un large échantillonnage de matériel vivant (rhizomes) et d'échantillons d'herbier (conservés à l'herbier d'Aix-Marseille Université, MARS), grâce à dix missions de prospection dans sept pays étrangers (*e.g.* Mesolonghi, Grèce ; figure 7). En incluant les récoltes de nos aimables collègues botanistes, au total 79

II. Systématique du genre *Arundo* en Méditerranée

stations d'*A. plinii s.l.* et 16 d'*A. donax* ont été examinées. Les stations échantillonnées par nos soins ont fait l'objet d'études morphométriques, avec neuf variables mesurées sur le terrain pour le matériel végétatif, et cinq variables quantifiées au laboratoire sous une binoculaire pour les pièces florales (15 mesures/variable/station). Concernant les analyses génétiques, nous avons choisi une méthode de biologie moléculaire à haute résolution, les empreintes multilocus AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ; Vos *et al.* 1995). Cet outil a été préféré aux séquences d'ADN chloroplastique classiquement utilisées, car ces dernières s'étaient déjà révélées insuffisamment variables dans le genre *Arundo* (Mariani *et al.* 2010 ; Grassi, comm. pers.). L'analyse génétique porte sur la portion de fragments polymorphes, soit 83% des 1046 marqueurs retenus.



Figure 7. Unique localité de sympatrie entre *A. plinii s.str.* (a) et *A. micrantha* (b), à Mesolonghi (Grèce ; photo Vila B.).

Les analyses génétiques et morphologiques ont mis en évidence un premier découpage confirmant la différenciation très nette entre *A. donax*, *A. formosana* et le groupe *A. plinii s.l.* Cependant, l'important polymorphisme et la variabilité génétique de ce dernier complexe autorise sa subdivision légitime en trois taxons que nous avons nommés en accord avec l'ICBN (McNeil *et al.* 2006 ; figure 8). Ce sont : (i) le circum-méditerranéen *A. micrantha*, possédant les plus grands organes végétatifs, (ii) l'italo-balkanique *A. plinii s.s.*, la plus petite

II. Systématique du genre *Arundo* en Méditerranée

et frêle espèce du genre *Arundo*, et (iii) l'apo- (ou néo-) endémique ligure *A. donaciformis* (Loisel.) Hardion *et al.*, caractérisé par une glume supérieure longuement ciliée (vs. glabre chez les deux autres), des pièces florales plus grandes et un plus haut niveau de polypléidie ($2n = 108$). Déjà décrit à Fréjus en 1828 par Jean-Louis Auguste Loiseleur-Deslongchamps, mais sous le nom de *Calamagrostis donaciformis* Loisel. (en raison de la présence d'une seule fleur par épillet), ce dernier taxon nécessitait une combinaison nouvelle par son intégration dans le genre *Arundo*. Malgré sa différenciation morphologique, génétique et cytogénétique, l'endémique ligure présente une forte affinité avec *A. plinii s.str.*, par contre ces deux derniers taxons se distinguent nettement d'*A. micrantha*.

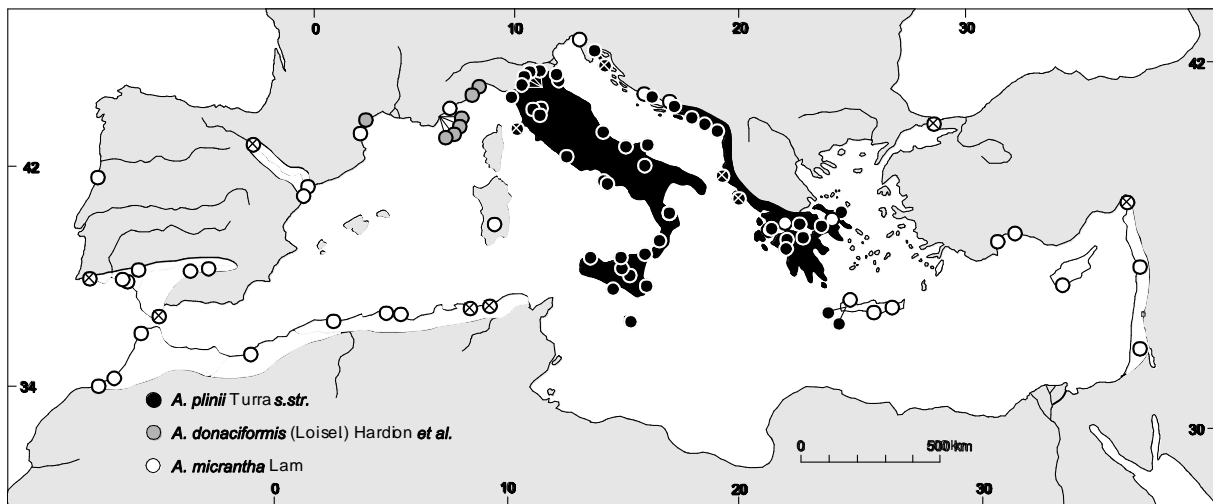


Figure 8. Révision taxonomique d'*A. plinii s.l.* en Méditerranée (Hardion *et al.* 2012) sur la base de caractères morphologiques et génétiques. Les cercles à croix indiquent les échantillons d'herbier identifiés uniquement sur des critères morphologiques.

Perspectives de Recherche en Méditerranée.

Au-delà de l'aspect taxonomique, ces travaux ont révélé la très forte clonalité des cannes. A l'exception d'*A. plinii s.str.*, aucun *Arundo* en Méditerranée ne présente de diversité génétique, ni de caryotypes. La diversité génétique neutre pouvant être un témoin de la capacité d'une espèce à s'adapter à des changements environnementaux contraignants, l'absence de variabilité génétique chez *A. donaciformis* semble alarmante dans le cadre de sa conservation. De plus, si l'absence de graine ne témoigne pas forcément de la stérilité totale de l'espèce, elle indique une reproduction sexuée défailante et donc un brassage génétique faible à absent. Une étude de génétique des populations semble donc nécessaire pour optimiser la conservation du patrimoine génétique de ce taxon menacé à Fréjus.

II. Systématique du genre *Arundo* en Méditerranée

L'endémique ligure *A. donaciformis* se situe sur la marge Nord-Ouest de l'aire Italo-Balkanique d'*A. plinii s.str.*, et malgré leurs niveaux de polyploïdie différents, ces deux taxons présentent une forte affinité génétique. Ces constats laissent supposer des scénarios phylogéographiques intéressants, impliquant des phénomènes de spéciation polyploïde. Ajoutés à des données phylo- et cytogénétiques supplémentaires, les résultats acquis durant cette étude peuvent être analysés dans le cadre de la phylogéographie d'*A. plinii s.str.*, seul *Arundo* génétiquement variable en Méditerranée. Ces travaux pourraient renseigner sur l'origine et la formation d'une apoendémique ligure, mais aussi sur les liens phylogénétiques qu'elle partage avec son espèce-sœur.

Enfin, la présence d'une seule lignée génétique non-fructifère pour *A. donax* et *A. micrantha* à travers le bassin méditerranéen reste une énigme sans équivalent bibliographique, excepté pour des espèces envahissantes (Poulin *et al.* 2005 ; Le Roux *et al.* 2007) ou à dispersion maritime (*e.g. Spartina maritima* (Curtis) Fernald ; Raybould *et al.* 1991 ; Yannic *et al.* 2004). En outre, le même clone méditerranéen d'*A. donax* a été retrouvé dans tout le Sud des Etats-Unis (Ahmad *et al.* 2008). Cette absence de diversité génétique pourrait être un indice de l'introduction ancienne de la canne de Provence et de son invasion passée dans le domaine méditerranéen. Bien que circum-méditerranéen, *A. micrantha* reste un taxon assez rare, à l'exception de certains cours d'eau et de villes antiques. Sa dispersion par l'Homme, puis sa persistance locale, pourrait expliquer sa large distribution, malgré sa clonalité et sa stérilité. Ces hypothèses peuvent être testées en phylogéographie par la recherche de populations sources. Pour *A. donax*, supposé natif d'Eurasie sub-tropicale, les investigations doivent s'orienter vers le Moyen- et l'Extrême- Orient. Par contre, une telle recherche paraît plus délicate pour *A. micrantha*, circonscrit uniquement au bassin méditerranéen, et pour lequel la majorité des stations connues a été étudiée.

II. Systématique du genre *Arundo* en Méditerranée

Annexes

II. Systématique du genre *Arundo* en Méditerranée

Arundo micrantha Lam. (Poaceae), the correct name for Arundo mauritanica Desf. and Arundo mediterranea Danin

Laurent Hardion, Régine Verlaque, Martin W. Callmander & Bruno Vila

Abstract

HARDION, L., R. VERLAQUE, M. W. CALLMANDER & B. VILA (2012). *Arundo micrantha* Lam. (Poaceae), the correct name for *Arundo mauritanica* Desf. and *Arundo mediterranea* Danin. *Candollea* 67: 131-135. In English, English and French abstracts.

Arundo micrantha Lam. (Poaceae) was validly published by Lamarck in 1791 but has been overlooked in the literature. Based on recent taxonomic and phylogenetic studies, this name is rehabilitated to designate a circum-Mediterranean taxon, with *Arundo mauritanica* Desf. and *Arundo mediterranea* Danin as later synonyms. For the first time, *Arundo micrantha* is recorded in the Flora of France based on two rediscoveries (Golfe-Juan and Ste-Lucie Island) and identifications in the wild, thanks to indications of older specimens in herbaria G, MARS, MPU and P. However, these two populations of *Arundo micrantha* are under severe threats and this species must be considered as Critically Endangered in France following IUCN Red List Categories.

Key-words

POACEAE – *Arundo* – Typification – Taxonomy – IUCN Red List

Résumé

HARDION, L., R. VERLAQUE, M. W. CALLMANDER & B. VILA (2012). *Arundo micrantha* Lam. (Poaceae), nom valide pour *Arundo mauritanica* Desf. et *Arundo mediterranea* Danin. *Candollea* 67: 131-135. En anglais, résumés anglais et français.

Arundo micrantha Lam. (Poaceae) a été validement publié par Lamarck en 1791, mais ignoré dans la littérature. Sur la base de récentes études taxonomiques et phylogénétiques, ce nom est réhabilité pour désigner un taxon circum-méditerranéen ayant pour synonymes postérieurs *Arundo mauritanica* Desf. et *A. mediterranea* Danin. Le recensement inédit d'*Arundo micrantha* dans la flore de France a été effectué grâce à la consultation d'échantillons issus des herbiers G, MARS, MPU et P, puis à la redécouverte *in situ* de deux stations (Golfe-Juan et Ile Ste-Lucie) et à leur identification. Cependant, ces deux populations d'*Arundo micrantha* sont très menacées et cette espèce doit être considérée comme en Danger Critique en France, d'après les catégories de la Liste Rouge de l'IUCN.

Addresses of the authors: LH, RV, BV: Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Biodiversité (IMBE, UMR 7263, CNRS), Université Aix-Marseille, campus St Charles, case 4, place Victor Hugo 3, 13331, Marseille, France.

Email (LH): laurent.hardion@imbe.fr

MWC: Missouri Botanical Garden, P.O. Box 299, St Louis, Missouri, 63166-0299, U.S.A. and Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, ch. de l'Impératrice 1, CP 60, 1292 Chambésy, Suisse.

Submitted on November 21, 2011. Accepted on February 6, 2012.

Edited by P. Bungener

Introduction

Before 2004, three distinct species were included in the genus *Arundo* L. (*Poaceae*): (1) *A. donax* L., the cosmopolitan Giant Reed from Sub-tropical Asia to the Mediterranean Basin, introduced in many regions; (2) *A. formosana* Haeck., a decumbent grass endemic from Taiwan, and (3) *A. plinii* Turra, a circum-Mediterranean taxon. *Arundo plinii* was revisited by DANIN (2004) and divided into three entities: (a) *A. plinii* s.s., a sub-endemic taxon from Southern France (Var: Fréjus; Aude: Sainte-Lucie Island) and northern Italy (Bologna: *locus classicus* following TURRA, 1780); (b) *A. collina* Ten., an Italo-Balkan *Arundo* described from Naples (TENORE, 1822), and (c) *A. mediterranea* Danin (*locus classicus*: Nahal Sorek, Israel, following DANIN, 2004), a new species corresponding to a branched reed from Algeria, Cyprus, Greece and Palestine.

On the basis of Art. 53.1 of the International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) (MCNEIL & al., 2006), DANIN (2004) published the new species *A. mediterranea* in order to replace *A. mauritanica* Desf. described from Algeria by DESFONTAINES (1798). In fact, this latter name is an illegitimate homonym of *A. mauritanica* previously used by POIRET (1789) to describe a species actually named *Ampelodesmos mauritanicus* (Poir.) T. Durand & Schinz (DURAND & SCHINZ, 1895). However, Desfontaines had distributed many duplicata of his Algerian collection among European herbaria such as P, B, G, K and MPU. One of these exsiccata was given to his friend Jean-Baptiste de Lamarck, as mentioned both on the label and the diagnosis (“D. Desfontaines” [D. = Dedit], “ill. gen.” [= “Illustration des Genres”]; Fig. 1 and 2). On the basis of this specimen, LAMARCK (1791) described *A. micrantha* Lam. (Fig. 2), seven years before the publication of DESFONTAINES (1798). Strangely, Lamarck’s name has been overlooked over the past centuries, and this binomial was generally considered as a synonym of *A. mauritanica* Desf. under *A. plinii* s.l.

A recent molecular phylogenetic study based on AFLP markers showed that all considered samples of *A. micrantha* are clearly monophyletic and belong to a well supported species (MARIANI & al., 2010; as *A. mediterranea*). DNA content analysis by flow cytometry and chromosome counts confirmed this singularity. In fact, this taxon exhibits a specific chromosome number of $2n = ca. 72$ (North-Africa and Crete) vs $2n = 76$ for *A. plinii* from Italy (HARDION & al., 2011). This chromosome number has been recently confirmed for various other populations from several Mediterranean countries (unpublished data).

Following Art. 11.4 of ICBN, *A. micrantha* remains the prevalent name of this species attached to the holotype housed in Lamarck’s Herbarium (P-LA). Considering that *A. micrantha* and *A. mauritanica* are not based on the same holotype,

the latter must be considered as synonym of *A. micrantha* (see Art. 8.1, 52.1 and 52.2 of ICBN). It is nevertheless impossible to know if they belong to the same gathering and we therefore consider isotypes of each taxon as hypothetical.

Taxonomy and nomenclature

Arundo micrantha Lam., Tabl. Encycl. 1: 196. 1791 (Fig. 1).

Typus: “Ex AFRICA”: *Desfontaines s.n.* (holo-: P-LA [P00564266]!; iso-: B [W02223]!, G [G00074067]!, K [K000366972]!, MPU [015598]!, P [P00307101]!).

= *Arundo mauritanica* Desf., Fl. Atlant. 1: 106. 1798 [non Poir., Voy. Barbarie 2: 104. 1789. = *Ampelodesmos mauritanicus* (Poir.) Durand & Schinz]. **Typus: ALGERIA:** “Herbier de la Flore Atlantique”, *Desfontaines s.n.* (holo-: P [P00307101]!; iso-: B [W02223]!, G [G00074067]!, K [K000366972]!, MPU [015598]!, P-LA [P00564266]!).

= *Arundo mediterranea* Danin in Wildenowia 34: 362. 2004. **Typus: ISRAEL:** Nahal Sorek, 8 km east of Gedera, 18.IX.2004, *Danin s.n.* (holo-: HUU!; iso-: B [1001822322, 100182323]!, E [00205435]!, MARS [00007, 00008]!).

Additional specimens examined. – **FRANCE. Languedoc-Roussillon:** Sainte Lucie, *Requien s.n.* (MARS-Ardoino [00011]); Aude, Coteau à Sainte-Lucie, près de Narbonne, 21.IX.1818, *Gautier s.n.* (G-DC); Sainte-Lucie, 19.V.1828, *Requien s.n.* (G); In insula St Luciae, X.1829, *Eudrefs s.n.* (P [P03161112, P03161120]); Ile Sainte-Lucie, près de Narbonne, 25.VIII.1864, *Gautier s.n.* (MPU, P [P03626575]); Ile Sainte-Lucie, 12.IX.1877, *Bonneau s.n.* (MPU); Ile Sainte Lucie, près de Narbonne, molasse marine, 15 m, 27.IX.1882, *Doumergue s.n.* (G, MARS [00012], MPU, P [P02656180, P02656198, P03161077, P03235090, P03626594]); Sainte-Lucie, 1891, *Requien s.n.* (MPU); Aude, Ile Sainte-Lucie, IX.1893, *Jonas-Martyr s.n.* (G, MPU, P [P02421019, P02421020, P02421021, P03161074, P03168006, P03235087, P03626559, P03626580]); Ile Sainte-Lucie, IX.1893, *Martin s.n.* (P [P03626574]); Ile Sainte-Lucie, IX.1893-94, *Sevittien & Sevittien s.n.* (G, MPU, P [P02421022, P03161075, P03235086, P03242364, P03242365, P03235079, P03626551, P03626552, P03626579]); Aude, Ile Sainte-Lucie, près de la station de chemin de fer, 20.II.1921, *Neyraud s.n.* (MPU); Port-la-Nouvelle, Ile Sainte-Lucie, between the island and railway, ca. 2 m, 43°03' 25"N 03°01' 52"E, 5.VIII.2011, *Hardion & al. s.n.* (MARS [00013], MARS [00014]). **Provence-Alpes-Côte d’Azur:** entre Cannes et Antibes, dans le Golfe de Juan, *Gay s.n.* (MPU); Golfe de Juan, 24.IX.1821, *Gay s.n.* (G); Route d’Antibes à Cannes, devant la villa “Jean Reynaud”, 10.X. 1868, *Thuret s.n.* (G); Golfe-Juan, 28.X.1868, *Moggridga s.n.* (P [P03626544]); Golfe-Juan, bords des ravines, 31.X. 1868, *Thuret s.n.* (G, P [P03161108]); Golfe Juan, non loin de la gare, presque en face du Château Robert, 27.X.1874, *Bernardin s.n.* (G, MPU, P [P02420203, P02656199, P03161104, P03626558]); Golfe-Juan, 5.XI.1878, *Consolat s.n.* (G); Golfe-Juan, XII.1904, *Mader s.n.* (G); Vallauris Golfe-Juan, in beach back, between road and railway, ca. 4 m, 43°33' 48"N 7°04' 07"E, 21.IX.2011, *Hardion & al. s.n.* (MARS [00015], MARS [00016]).

Morphology. – Our observations in the wild confirmed that *A. micrantha* is characterized by clearly branched stems, as previously emphasized by DESFONTAINES (1798) and DANIN (2004), coupled with a tussock habit and high culms (2–4 m) as described



Fig. 1. – Holotypus of *Arundo micrantha* Lam.

[Desfontaines s.n., P-LA] [© MNHN CRHST-CNRS. Reproduced with permission]

by DANIN (2004). However, these features are rarely present on herbarium specimens. On exsiccata, *A. plinii* complex (including *A. micrantha*) differs from *A. donax* by its spikelets with 1- (2) vs 3-5 flowers as mentioned by LAMARCK (1791). Moreover, our study on many herbarium exsiccata (G, MARS, MPU, P) shows that *A. micrantha* differs from the rest of *A. plinii* complex by a larger culm diameter under the panicle (> 5 mm vs < 4 mm). This new morphological character allows us to consider *A. micrantha* holotypus of Lamarck as conspecific with *A. mauritanica* Desf. and *A. mediterranea* Danin.

However, a broad morphological investigation coupled with a phylogenetic analysis on a Mediterranean sampling is needed to clarify the complex taxonomic delimitations in this genus. Because of many erroneous identifications in Herbarium exsiccata, this study will have to provide more discriminating characters, useful on vegetative as well as on reproductive material.

Ecology, distribution and conservation. – Notes on exsiccata labels gave us insights into the ecology of *A. micrantha* and its affinities with wetlands. This species mainly occurs on riverbanks and beach backs, in addition to ruderal sites. Because of its former synonymy under *A. plinii* s.l. and its resemblance to *A. donax*, the *A. micrantha* distribution was dramatically underestimated in the Mediterranean basin. Since 2004, it has been reported from Algeria, Crete, Cyprus, Greece, Lebanon, Morocco, Palestine and Rhodes (DANIN, 2004; DOBIGNARD & CHATELAIN, 2010). The careful examination of several specimens of *A. plinii* s.l. (G, MARS, MPU and P) allowed us to rediscover and identify wild populations in Golfe-Juan (Provence-Alpes-Côte d'Azur) and Sainte-Lucie Island (Languedoc-Roussillon) as *A. micrantha*. This discovery adds for the first time this species to the Flora of France, in addition to *A. donax* and *A. plinii* (sensu DANIN, 2004) from Fréjus-Saint-Raphaël. Our field observations of these restricted populations revealed their highly threatened status. In Golfe-Juan, two patches (10 m²) subsist on the urban littoral of French Riviera, between the back beach road and the railway, endangered by a project to extend train rails. According to numerous exsiccata, the population of Sainte-Lucie Island was the most visited of the French localities. Already impacted by human activity in the 19th century (as indicated on P [032 42232]), this population is now drastically reduced to 4 m², without flowering for at least three years. In addition, other localities of *A. plinii* s.l. as Salses-le-Château (Languedoc-Roussillon) and Saint-Tropez (Provence-Alpes-Côte d'Azur) respectively mentioned by GAUTIER (1912-1913) and CAMUS & CAMUS (1912), have never been seen again. *Arundo plinii* s.l. being protected at regional scale (Provence-Alpes-Côte d'Azur and Languedoc-Roussillon), *A. micrantha* must be included under this status. However, *A. micrantha* needs urgent specific protection on French territory and may be considered as Critically Endangered (CR A1a, c; C1; D) in France following IUCN Red List Categories and Criteria (IUCN, 2001).

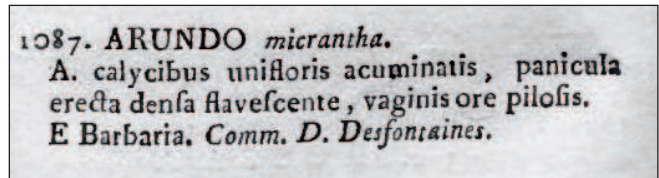


Fig. 2. – The *Arundo micrantha* Lam. diagnosis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Olivier Argagnon, Katia Diadéma, Henri Michaud, James Molina and Virgile Noble from the Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles for their help in field. The authors are also grateful to Marc Pignal (P) and Nick Turland (MO) for clarifying the nomenclatural issue, and MPU staff who provided us helpful information regarding several exsiccata. Financial support was provided by grants from the ECCOREV research federation, PIRVE “Canne de Pline” from the CNRS, the “Ministère d’Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement” and the “Société Botanique de France”. Valuable comments of an anonymous reviewer greatly improved our manuscript.

References

- CAMUS, E. G. & A. A. CAMUS (1912). *Florule de Saint-Tropez et de ses environs immédiats*. Paul Lechevalier, Paris.
- DANIN, A. (2004). *Arundo* (Gramineae) in the Mediterranean reconsidered. *Willdenowia* 34: 361-369.
- DESFONTAINES, R. (1798). *Flora Atlantica, Sive Historia Plantarum, Quae in Atlante, Agro Tunetano et Algeriensi Crescunt*. Vol. 1. Paris.
- DOBIGNARD, A. & C. CHATELAIN (2010). *Index Synonymique, flore d’Afrique du Nord, Vol. 1: Pteridophyta, Gymnospermae, Monocotyledonae*. Conservatoire et Jardin botaniques de Genève.
- DURAND, T. & H. SCHINZ (1895). *Conspectus florae Africae ou Énumération des plantes d’Afrique*. Vol. 5. Bruxelles.
- GAUTIER, G. (1912-1913). *Catalogue de la flore des Corbières, mis en ordre par L. Marty*. Société d’études scientifiques de l’Aude, Carcassonne.
- HARDION, L., R. VERLAQUE, A. FRIDLINDER & B. VILA (2011). Chromosome data 11. *Taxon* 60: 1221.
- IUCN (2001). *IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1*. IUCN Species Survival Commission, IUCN, Gland & Cambridge.
- LAMARCK, J. B. A. P. M. DE (1791). *Tableau Encyclopédique et Méthodique des trois règnes de la nature: Botanique*. Vol. 1. Paris.
- MARIANI, C., R. CABRINI, A. DANIN, P. PIFFANELLI, A. FRICANO, S. GOMARASCA, M. DICANDILO, F. GRASSI & C. SOAVE (2010). Origin, diffusion and reproduction of giant reed (*Arundo donax* L.): a promising weedy energy crop. *Ann. Appl. Biol.* 157: 191-202.

**Laurent Hardion,¹ Régine Verlaque,^{1*} Alain Fridlender²
& Bruno Vila¹**

*1 Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléocécologie (IMEP),
UMR 6116, Case 4, Université de Provence, 3 Place Victor Hugo,
13331 Marseille Cedex 3, France*

*2 Institut Universitaire de Technologie, DENTES, Case 75, Univer-
sité de Provence, 3 Place Victor Hugo, 13331 Marseille Cedex 3,
France*

* Author for correspondence: *regine.verlaque@univ-provence.fr*

All materials gathered in situ, cultivated and counted by L. Hardion, R. Verlaque and B. Vila; cytometry flow conducted by A. Fridlender.

FCM: Internal standard (*Petunia hybrida* PxPC6, 2C = 2.85 pg; Marie & Brown, 1993) was used to determine DNA content by flow cytometry (Partec CyFlow 532 nm laser cytometer) following the technique described by Fridlender & al. (2002).

This study was supported by the town community of Fréjus-Saint-Raphaël and the Société Botanique de France. Authors are grateful to colleagues that helped us in plant localisation and sampling.

**New chromosome number (cytotype) for the species

POACEAE

Arundo donax L.

$2n = 18x = \text{ca. } 108\text{--}110$, CHN. Spain, Catalonia, Amposta, on the river bank of Ebro River, 40°44'12" N, 0°34'02"E, 01 Jan 2010,

Hardion D2/09-95 (MARS); Tunisia, Sidi Bou Said, on the roadside, 36°52'13"N, 10°20'46"E, 13 Nov 2009, *Hardion D3/09-94* (MARS) (Fig. 4A); France, Bouches-du-Rhône, Marseille, Calanques of Sugiton, in matorral, 43°12'43"N, 5°27'10"E, 29 Sep 2009, *Fridlender 09-22* (MARS).

$2n \sim 18x$, FCM. 2C DNA = 4.5 pg, France, Bouches-du-Rhône, Carry-le-Rouet, in wasteland, 43°20'06"N, 5°08'27"E, 08 Aug 2009, *Verlaque D1* (MARS).

$2n \sim 18x$, FCM. 2C DNA = 4.7 pg, Tunisia, Sidi Bou Said, on the roadside, 13 Nov 2009, *Hardion D3* (MARS); Greece, Crete, Kolymvari, 35°32'11"N, 23°47'30"E, 26 Apr 2009, *Vila D4* (MARS).

$2n \sim 18x$, FCM. 2C DNA = 4.8 pg, Spain, Catalonia, Amposta, on the river bank of Ebro river, 40°44'12"N, 0°34'02"E, 01 Jan 2010, *Hardion D2* (MARS).

Arundo plinii Turra s.l.

** $2n = 12x = \text{ca. } 70\text{--}72$ CHN. Algeria, Great Kabylia, Tizi-Ouzou, in urban environment, 36°52'13"N, 4°02'48"E, 30 Nov 2009, *Ait Said C10/09-81* (MARS) (Fig. 4D); Algeria, Tipasa, 28 Oct 2009, *Baumel C9/09-78* (MARS); Greece, Crete, Kissamos, Kolymvari, on a river bank, 35°32'11"N, 23°47'30"E, 26 Apr 2009, *Vila C2* (MARS).

** $2n = 12x = \text{ca. } 76$, CHN. Italy, Emilia-Romagna, Bologna, on the Reno river bank, 44°37'06"N, 11°19'04"E, 16 Feb 2010, *Hardion C7/10-15* (MARS); Italy, Emilia-Romagna, Bologna, Montecalvo, on the river bank, 44°25'20"N, 11°23'48"E, 16 Feb 2010, *Hardion C8b/10-16* (MARS) (Fig. 4C); Italy, Emilia-Romagna, Bologna, Sasso Marconi, S-W Bologna, by the roadside, 44°22'57"N, 11°15'01"E, 16 Feb 2010, *Hardion C8a/10-22* (MARS).

** $2n = \text{ca. } 108$, CHN. France, Var, Fréjus, Avenue Agachon, on a isolated wasteland near the cemetery, 43°26'14"N, 6°43'54"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B11/10-07* (MARS) (Fig. 4B); France, Var, Fréjus, halophytic Villepey ponds, 43°24'34"N, 6°43'58"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B1/09-24* (MARS); France, Var, Fréjus, La Gabelle on the river bank in the Vallon de Valescure, 43°25'55"N, 6°45'52"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A7/09-17* (MARS); France, Var, Saint-Raphaël, quarry of the Petits Caous, by the roadside, 43°26'00"N, 6°49'30"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B6/09-77* (MARS); France, Hérault, Lespignan, at the edge of a vineyard, 43°16'30"N, 3°09'22"E, 31 Dec 2009, *Hardion C6/09-98* (MARS).

$2n \sim 12x$, FCM. 2C DNA = 3.1 pg; Italy, Tuscany, Volterra, at the edge of a field, 43°23'43"N, 10°52'54"E, 15 Feb 2010, *Hardion C5* (MARS); Greece, Crete, Kissamos, Kolymvari, on a river bank, 35°32'11"N, 23°47'30"E, 26 Apr 2009, *Vila C2* (MARS).

$2n \sim 12x$, FCM. 2C DNA = 3.2 pg; Italy, Emilia-Romagna, Bologna, on the Reno river bank, 44°32'45"N, 11°18'57"E, 16 Feb 2010, *Hardion C4* (MARS); Italy, Emilia-Romagna, Bologna, Sasso Marconi, on the roadside, 44°22'57"N, 11°15'01"E, 16 Feb 2010, *Hardion C8a* (MARS); Italy, Emilia-Romagna, Bologna, Montecalvo, on the river bank, 44°25'20"N, 11°23'48"E, 16 Feb 2010, *Hardion C8b* (MARS).

$2n \sim 12x$, FCM. 2C DNA = 3.3 pg; Italy, Emilia-Romagna, Bologna, on the Reno river bank, 44°37'06"N, 11°19'04"E, 16 Feb 2010, *Hardion C7* (MARS); Algeria, Tipasa, 28 Oct 2009, *Baumel C9* (MARS).

$2n \sim 18x$, FCM. 2C DNA = 4.6 pg, France, Hérault, Lespignan, at the edge of a vineyard, 43°16'30"N, 3°09'22"E, 31 Dec 2009, *Hardion, Verlaque & Vila C6* (MARS); France, Var, Fréjus, in humid grassland near the Buddhist Pagoda, 43°26'41"N, 6°44'59", 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B13* (MARS); France, Var, Fréjus, Rue de la Madeleine, on a small plot of isolated ruderal land, 43°25'59"N, 6°45'08"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A6* (MARS).

$2n \sim 18x$, FCM. 2C DNA = 4.7 pg, France, Var, Fréjus, in a ditch, behind the Colle de Grune cemetery, 43°28'33"N, 6°44'46"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A1* (MARS); France, Var,

Fréjus, Secteur Gallieni, between a dwelling and the road, in waste land, 43°26'50"N, 6°45'11"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A2* (MARS); France, Var, Fréjus, Chemin de Casteu, between the maquis shrubland and the roadside, around a small water course, 43°26'58"N, 6°45'43"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A3* (MARS); France, Var, Fréjus, Rue de la Montagne, in wasteland, 43°26'26"N, 6°45'25"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A4* (MARS); France, Var, Fréjus, Rond-point Tabarka, between a dwelling and the road, 43°26'16"N, 6°44'57"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A5* (MARS); France, Var, Fréjus, Quartier de La Gabelle, on the river bank of the Vallon de Valescure in urban environment, 43°25'55"N, 6°45'52"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A7* (MARS); France, Var, Fréjus, between the "RD37" roadside and Villa Aurélienne, 43°26'40"N, 6°44'22"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A9* (MARS); France, Var, Fréjus, Avenue Léotard, at the edge of a vineyard, 43°26'10"N, 6°45'32"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A10* (MARS); France, Var, Fréjus, Villepey ponds, in a halophytic place, 43°24'34"N, 6°43'58"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B1* (MARS); France, Var, Fréjus, Saint-Aygulf, Grand Boucharel beach, at the river mouth, 43°22'22"N, 6°42'49"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B2* (MARS); France, Var, Fréjus, along the Reyran river, at the edge of the quarry, 43°29'26"N, 6°44'40"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B4* (MARS); France, Var, Fréjus, Pont du Duc quarry, on mounds of earth, 43°28'23"N, 6°46'22"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B5* (MARS); France, Var, Fréjus, Pont de Barban (Estérel), in a *Nerium oleander* wadi, 43°28'31"N, 6°49'49"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B7* (MARS); France, Var, Fréjus, at the junction between the Real watercourse and the Chemin de Bagnols 43°29'02"N, 6°41'23"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B10* (MARS); France, Var, Fréjus, across the old

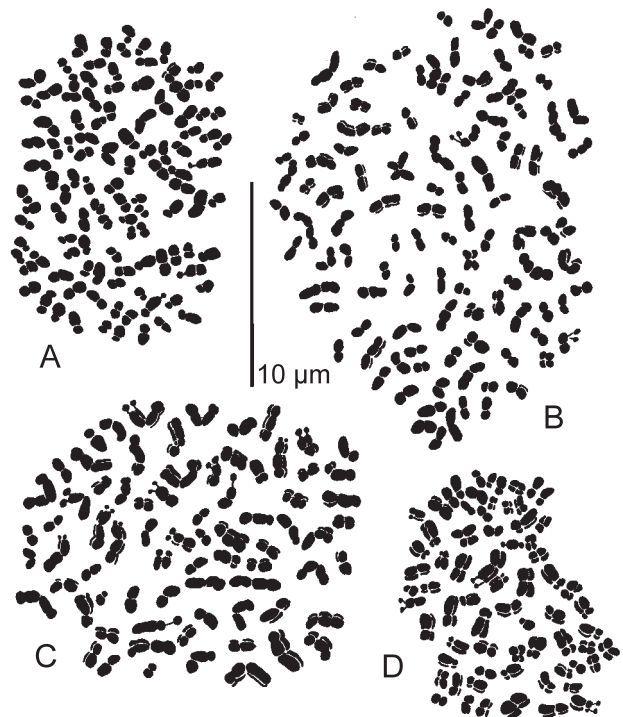


Fig. 4. A, Root tip metaphases of *Arundo donax* ($2n = 110$, Tunisia, Sidi Bou Said, *Hardion D3/09-94*) and **B–D**, *A. plinii* s.l.: **B**, $2n = 108$, France, Var, Fréjus, *Hardion, Verlaque & Vila B11/09-17*; **C**, $2n = 76$, Italy, Emilia-Romagna, Bologna, near Montecalvo, *Hardion C8b/10-16*; **D**, $2n = 70$, Algeria, Great Kabylia, Tizi-Ouzou, *Ait Said C10/09-81*).

Roman Bridge, in a watercourse, 43°26'17"N, 6°42'24"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B12* (MARS); France, Var, Saint Raphaël, quarry of the Petits Caous, by the roadside, 43°26'00"N, 6°49'30"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B6* (MARS); France, Var, Saint Raphaël, Les Arcs/Le Muy, beside a highway, 43°27'9"N, 6°31'14"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B9* (MARS); France, Var, Saint Raphaël, Agay, on the railway embankment, 43°25'59"N, 6°51'24"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B8* (MARS); France, Var, Saint Raphaël, Puget-sur-Argens, in wasteland, around the football stadium, 43°27'14"N, 6°40'43"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B3* (MARS).

$2n \sim 18x$, FCM. 2C DNA = 4.8 pg, France, Var, Fréjus, Avenue de Valescure, in wasteland, 43°26'15"N, 6°45'56"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila A8* (MARS); France, Var, Fréjus, Avenue de l'Agachon, in wasteland next to the cemetery, 43°26'14"N, 6°43'54"E, 24 Jan 2010, *Hardion, Verlaque & Vila B11* (MARS).

Among the three basic chromosome numbers suggested for the Arundinoideae Burmeist. ($x = 6, 9, 12$; GPWG, 2001), like Conert (1961), we chose $x = 6$, because it is the only one arithmetically compatible with the chromosome data of the other genera of this subfamily (e.g., *Phragmites*, Gorenflot & al., 1972b; Clevering & Lissner, 1999). Until 2004, the genus *Arundo* included three species: the cosmopolitan *A. donax* L., the Asiatic endemic *A. formosana* Hackel, and the Mediterranean *A. plinii* Turra s.l. Nevertheless, in recent works, Danin (2004) and Danin & al. (2008) divided the latter species into three distinct taxa: (1) *A. plinii* s.str., a NW Mediterranean endemic species restricted to N Italy (Bologna on Reno banks: locus classicus) and Southern France (Var: Fréjus and Aude: Ste-Lucie Island); (2) *A. collina* Ten., occurring in central Mediterranean area (C & S Italy, Greece, Crete); and (3) *A. mediterranea* Danin, occurring in W, S & E Mediterranean area (Spain, N Africa, Greece, Crete, Turkey, Cyprus and Palestine).

Our study confirms the already known chromosome number of *A. donax* in the Mediterranean Basin (Pizzolongo, 1962; Fernandes & Queiros, 1962; Gorenflot & al., 1972a): $2n = ca. 110$. Its karyotype is symmetrical, with small (0.9–1.9 μm) and generally metacentric chromosomes (Fig. 4A). However, some data indicate lower ploidy levels in Asia: $2n = 10x = 60$ in Thailand (Larsen, 1963) and $2n = 12x = 72$ in India (Christopher & Abraham, 1971).

In contrast, *A. plinii* s.l. exhibits a high variability in the Mediterranean Basin (Fig. 4B–D). We confirmed the dodecaploid level ($12x$, $2n = 72$) reported in the literature from Portugal, Coimbra (Fernandes & Queiros, 1969) and Italy, Naples (Pizzolongo, 1962). In addition to this previous euploid number, our counts showed a new ploidy level in France and strong aneuploidy events elsewhere. The frequent meiotic irregularities described by Pizzolongo (1962) probably explain these phenomena. Thus, the *A. plinii* s.l. complex is composed of at least three distinct cytotypes, nevertheless their geographical distribution differs from those of the three species proposed by Danin (2004) and Danin & al. (2008).

(1) All French individuals show a new and higher ploidy level, $2n = 18x = 108$ (Fig. 4B), and a relatively symmetrical karyotype. As suggested in numerous cases (Harlan & DeWet, 1975; Soltis & al., 2010), the most probable hypothesis for the origin of this euploid cytotype may be: the cross between a reduced gamete ($6x$) and a diplogamete ($12x$, $2n$ -gamete or unreduced gamete) from progenitors having $2n = 12x = 72$.

(2) All North Italian samples are characterised by: $2n = 12x = ca. 76$. This hyper-aneuploid cytotype possesses a relatively asymmetrical karyotype, with numerous satellites (Fig. 4C).

(3) In N Africa and Crete, we found $2n = 12x = ca. 70–72$. The chromosomes of this hypo-aneuploid cytotype are slightly smaller than those of the two others (Fig. 4D).

As morphological and cytological studies remain particularly difficult to carry out in the *Arundo* genus, flow cytometry has allowed

us to quickly examine many individuals and to easily measure their ploidy level. For example, analyses of 23 representative populations in France evidence the occurrence of only one new cytotype of *A. plinii* in Fréjus-Saint-Raphaël. Because of the variance of cytometry values, unfortunately this method does not distinguish the aneuploid cytotypes ($2n = 76$ vs. $2n = 70–72$). Thus, chromosome counts by light microscopy are essential to obtain accurate numbers.

In conclusion, to confirm and complete these first data, a broader sampling in the *A. plinii* s.l. complex is needed, involving taxonomical and phylogeographical investigations.

Literature cited

- Christopher, J. & Abraham, A. 1971. Studies on the cytology and phylogeny of South Indian grasses: I. Subfamilies Bambusoideae, Oryzoideae, Arundinoideae and Festucoideae. *Cytologia* 36: 579–594.
- Clevering, O.A. & Lissner, J. 1999. Taxonomy, chromosome numbers, clonal diversity and population dynamics of *Phragmites australis*. *Aquatic Bot.* 64: 185–208.
- Conert, H.J. 1961. *Die Systematik und Anatomie der Arundineae*. Weinheim: Cramer.
- Danin, A. 2004. *Arundo* (Gramineae) in the Mediterranean reconsidered. *Willdenowia* 32: 191–194.
- Danin, A., Blanché, C., Royo, F. & Arrufat, M. 2008. *Arundo mediterranea*. P. 469 in: Greuter, W. & Raus, T. (eds.), *Med-Checklist Notulae*, 27. *Willdenowia* 38: 465–474.
- Fernandes, A. & Queiros, M. 1969. Contribution à la connaissance cytotaxonomique des Spermaphytes du Portugal. I: Graminées. *Bol. Soc. Brot.*, Sér. 2, 43: 3–140.
- Fridlender, A., Brown, S.C., Verlaque, R., Crosnier, M.T. & Pech, N. 2002. Cytometric determination of genome size in *Colchicum* species (Liliales, Colchicaceae) of the western Mediterranean area. *Pl. Cell Rep.* 21: 347–352.
- Gorenflot, R., Cartier, D. & Raicu, P. 1972a. Caryologie de la Canne de Provence. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, Sér. D. 274: 391–393.
- Gorenflot, R., Raicu, P., Cartier, D., Ciobanu, I., Stoian, V. & Staicu, S. 1972b. Le complexe polyploïde du *Phragmites communis* Trin. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, Sér. D. 274: 1501–1504.
- GPWG (Grass Phylogeny Working Group). 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 88: 373–457.
- Harlan, J.R. & DeWet, J.M.J. 1975. The origins of polyploidy. *Bot. Rev.* 41: 361–390.
- Larsen, K. 1963. Studies in the flora of Thailand. 14. Cytological studies in vascular plants of Thailand. *Dansk Bot. Ark.* 20: 211–275.
- Marie, D. & Brown, S. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species, *Biol. Cell* 78: 41–51.
- Pizzolongo, P. 1962. Osservazione cariologiche su *Arundo donax* L. e *Arundo plinii* Turra. *Ann. Bot. (Rome)* 27: 173–188.
- Soltis, D., Buggs, R., Doyle, J. & Soltis, P. 2010. What we still don't know about polyploidy. *Taxon* 59: 1387–1403.

Revised systematics of Mediterranean *Arundo* (Poaceae) based on AFLP fingerprints and morphology

Laurent Hardion, Régine Verlaque, Alex Baumel, Marianick Juin & Bruno Vila

Aix Marseille Université, CNRS, IMBE UMR 7263, 13331, Marseille, France

Author for correspondence: Laurent Hardion, laurent.hardion@imbe.fr

Abstract The systematics of the genus *Arundo* (Poaceae) remains poorly resolved because of the overlap of morphological characters classically used in the taxonomy of the genus and insufficient variation of DNA sequences. The main aim of this study is to delimit genetic clusters with AFLP fingerprints and to compare them with morphological data. On the basis of extensive sampling in the Mediterranean area, AFLP markers clearly showed five clusters. Despite overlapping values, morphometric analyses strongly confirm these clusters, and new qualitative features allow the recognition of five taxa: the Taiwanese *A. formosana*, the cosmopolitan *A. donax*, the circum-Mediterranean *A. micrantha*, the Italo-Balkan *A. plinii* and the Franco-Ligurian *A. donaciformis* (Loisel.) Hardion & al. comb. nov. Additionally, this study shows a correlation between genetic diversity, caryopsis production and ploidy level. However, the lack of genetic diversity for *A. micrantha* and *A. donax* in the Mediterranean area remains enigmatic.

Keywords *Arundo*; clonal reproduction; Mediterranean biogeography; polyploidy; taxonomy

■ INTRODUCTION

Arundo L. (Poaceae) includes three to five taxa distributed from the Mediterranean Basin to tropical Asia (Conert, 1961; Grass Phylogeny Working Group, 2001; Danin, 2004). It is the generic type of Arundinoideae, the most unresolved grass subfamily, historically known as a dustbin group (Prat, 1932; Renvoize, 1981; Barker & al., 1995, 1999; Linder & al., 1997). The genus is defined by high, rigid culms, clonal rhizomatous propagation and wetland affinities, rare features shared with Bambusoideae. However, the systematics of *Arundo* has remained poorly elucidated despite their use since ancient times, as described by Theophrastus and Pliny the Elder and shown by archeological work (Figueiral & al., 2010).

Formerly the only reed genus, *Arundo*, included up to 238 taxa (Govaerts, 1999), but almost all of these were moved to 31 other genera since (e.g., *Calamagrostis* Adans., *Phragmites* Adans., *Bambusa* Schreb.). A decade ago, *Arundo* was reduced to only three species: *Arundo donax* L., the subtropical Eurasian Giant Reed, invasive in many warm regions; *A. formosana* Hack., a decumbent grass from Taiwan and Ryukyu Islands; and the circum-Mediterranean *A. plinii* Turra s.l. In 2004, Danin divided the latter into three species: *A. plinii* s.str., a taxon from Bologna (N Italy; locus classicus), Sainte-Lucie Island and Fréjus (S France); *A. collina* Ten. (= *A. hellenica* Danin & al., 2002), an Italo-Balkan species described from Napoli; and *A. mediterranea* Danin (= *A. mauritanica* Desf. nom. illeg.) found in Algeria, Cyprus, Greece and Palestine. However, the latter is a later synonym of *A. micrantha* Lam. (1791) described from N Africa (Hardion & al., 2012).

This study was undertaken because of the uncertain taxonomic status of several Mediterranean reeds despite Danin's revision (2004). In fact, his "deliberately preliminary" work was based only on some vegetative (height, habit, leaf shape)

and ecological characters rarely present or mentioned in herbarium specimens. More generally, the high variability of morphological characters among *Arundo* species has led to many erroneous identifications, as shown by our re-identification of the population from Sainte-Lucie as *A. micrantha* (Hardion & al., 2012). Moreover, our recent cytological investigations are incongruent with previous taxonomic treatments (Hardion & al., 2011). Finally, *A. plinii* s.l. is protected in France and in-depth knowledge (e.g., taxonomic delimitation, structure of genetic diversity and reproduction system) is urgently needed for conservation purposes (Olivier & al., 1995; Callmander & al., 2005).

Molecular studies in *Arundo* had already shown the lack of genetic variation using chloroplast spacers (*rps16-trnK*, *rpl32-trnL*, *psbA-trnH*) and ISSR markers (Grassi & al., 2008; Grassi, pers. comm.). Our preliminary investigations confirm these results through the absence of informative mutations in three additional cpDNA sequences (*matK* gene, *trnL-trnF* and *rps4-trnT2* spacers). Despite the high potential of AFLP fingerprinting for homoplasmy and its drawbacks for phylogenetic use (dominant markers with only two states and uncertain homology between fragment sizes; Koopman, 2005), we chose this method in order to generate several polymorphic markers distributed across the whole genome, a feature particularly powerful for clonal species and in case of reticulate evolution. The AFLP method had already been used to reconstruct species relationships in evolutionarily complex groups (Després & al., 2003). Within Poales, these molecular fingerprints provided a basis for delimiting phylogenetic clusters in *Phragmites* (Lambertini & al., 2006), *Carex* L. (Jiménez-Mejías & al., 2011) and *Typha* L. (Lamote & al., 2005; Na & al., 2010). Moreover, a recent study has shown the capacity of the AFLP method to distinguish different genotypes within *Arundo donax* (Mariani & al., 2010).

The aim of this study is (1) to delimit genetic groups in *Arundo* using AFLP fingerprinting, (2) to test the congruence of genetic delimitations with multivariate analyses of quantitative morphological characters, and (3) to present a new identification key using the most reliable morphological features.

■ MATERIALS AND METHODS

Plant material. — On the basis of localities reported in the literature, by naturalists and on herbarium specimens (BM, E, G, K, MARS, MPU, P), a total of 96 sites were investigated (Appendix), including 79 sites for *A. plinii* s.l. and 16 for *A. donax*. In order to include all *Arundo* species, one individual of the morphologically differentiated *A. formosana* was included in the molecular analyses. The taxonomic assignment of Mediterranean reeds to *A. donax* or *A. plinii* s.l. is our basal hypothesis for the purpose of the molecular and morphological analyses. In addition, many herbarium samples were considered in order to estimate species distributions. At each site, material was collected for voucher specimens (MARS), and budding rhizomes for DNA extraction. These cuttings were greenhouse-cultivated in pots of loam soil to obtain healthy leaves without fungal contamination (Zhang & al., 1997). After one year, all dead rhizomes were counted to estimate survival rates reflecting specific vegetative vigor. Then, plants were cultivated in the Botanical Garden of Aix-Marseille University.

DNA extraction and AFLP fingerprints. — *Arundo* species form densely clonal patches by rhizome propagation. Given this predominately vegetative reproduction, we consider only one sample per patch for molecular analyses. About 50 mg of silica-dried leaves from greenhouse-cultivated samples were crushed with liquid nitrogen. Total DNA was extracted following Doyle & Doyle (1987) with the following modifications: 1.4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8 and 4% hexadecyltrimethyl-ammonium bromide. After precipitation with 95% ethanol, the centrifuged pellets were washed in 70% ethanol, dried and suspended in TE-buffer with RNase. DNA concentrations were measured using a photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany) and diluted to 50 ng/μL.

The AFLP procedure followed Vos & al. (1995) with slight modifications: 300–1000 ng of DNA was digested for 3 h at 37°C with 6 units of EcoRI (MBI Fermentas, Mundolsheim, France) and for 3 h at 65°C with 4 units of Tru9I (MBI Fermentas) in a total volume of 25 μL. Digestion products were immediately ligated for 8 h at room temperature by adding 2.5 pmol and 25 pmol of EcoRI and MseI adaptors, respectively, 0.5 units of T4 DNA ligase and 10 mM of ATP (MBI Fermentas) in a final volume of 25 μL. Pre-amplification was performed in 50 μL volumes containing 5 μL of 8-fold diluted ligation product, 10 pmol of EcoRI (+A) and MseI (+C) primers, 0.16 mM of dNTPs, 0.65 mM of MgCl₂ and 1.5 units of *Taq* DNA polymerase (Q-Biogen, Illkirch, France). The pre-amplification thermocycle profile was 94°C for 2 min, followed by 20 cycles at 94°C for 45 s, 56°C for 45 s, 72°C for 1 min and 72°C for 10 min.

Six primer combinations were chosen for the selective PCR: EcoRI-AAC/MseI-CAA, EcoRI-AGC/MseI-CTG, EcoRI-ACG/MseI-CAC, EcoRI-ATG/MseI-CTA, EcoRI-ATC/MseI-CTC and EcoRI-AGG/MseI-CGG, dyed with 6-FAM fluorescence at 5' end (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). Selective amplification was performed in 20 μL volumes with 5 pmol of each primer, 0.65 mM of MgCl₂, 0.5 mM of dNTPs, 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Q-Biogen) and 5 μL of 100× diluted pre-amplification. The selective amplification thermocycle profile was 94°C for 2 min, 10 cycles of 94°C for 30 s, 65°C for 30 s (step –0.7°C per cycle), 72°C for 1 min, followed by 20 cycles at 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, 72°C for 1 min and 72°C for 5 min. PCR products were separated and quantified on an ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, U.S.A.). The reliability of AFLP markers was checked by repeating the complete analysis from DNA amplification to AFLP screening on 10 samples for each pair of primers.

Analyses of genetic structure. — AFLP fingerprints were generated from electrophoretogram alignments using GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems). Putative loci were defined as any fragment with a minimum amplitude of 200 Relative Fluorescent Units (RFU) occurring in at least one electrophoretogram. All samples were scored for peak absence or presence for each marker from 50 to 500 bp, and all overlapping peaks were discarded. Unfortunately, electrophoretograms from old herbarium specimens (>20 years) had to be removed from the analyses because they show clear DNA damage and a lack of fragments larger than 200 bp. To delimit *Arundo* taxa, a two-step approach was adopted. First, AFLPs were explored without any a priori clustering hypothesis, using a principal coordinate (PCo) analysis on Jaccard distances with ade4 R-package (Thioulouse & al., 1997) in R software v2.14.1 (R Development Core Team, 2010). Second, a discriminant Analysis of principal components (DAPC) tested the previously inferred clustering, using adegenet R-package (Jombart & al., 2010). This method uses principal components to perform a discriminant analysis on genetic variation. Whenever group prior information is unknown, the DAPC tries different numbers of clusters based on a K-means clustering of principal components and uses a Bayesian information criterion (BIC) to assess the best number of clusters. Because DAPC is a model-free approach which does not require prior information on the clustering, its use is particularly appropriate for systematic analysis. For each cluster, descriptive statistics such as number of fragments (F), number of specific fragments (SF), percentage of polymorphic fragments (%P) and Nei's genetic diversity index (*D*) were obtained using the AFLPdat package (Ehrich, 2006). Moreover, the Clones-function from this package offered a basis to detect multi-locus lineages (MLLs) and discredits genotypes generated by somatic mutations or genotyping errors (De Witte & al., 2011). According to our taxonomic objectives, the largest pairwise genetic distance among the 10 reliability tests was defined as a consistent MLL threshold.

Morphology. — At each site, 15 samples from the same clonal patch were measured, i.e., a total of 930 samples of *A. plinii* s.l. (in 62 sites) and 45 samples of *A. donax* (in

3 sites). The 14 quantitative characters were height of culm with panicle (C), node number/culm (N), internode length (measured halfway along the culm; eC), culm basal diameter (\varnothing C), panicle length (P), rhizome internode length (eR) and diameter (\varnothing R), length (Lf) and width (lf) of the leaf blade from the middle part of the main axis, lengths of lower (G1) and upper (G2) glumes, lemma (L), palea (pa) and lemma hairs (pL) of spikelets collected in the middle part of the panicle. All observed Caryopses were counted to estimate a rate of seed production.

To delimit *Arundo* taxa, a two-step approach was adopted for the morphometric data. First, a principal component analysis (PCA) of quantitative data shows potential clusters among all measured samples. The aim of the second step is to test and explain these taxonomic hypotheses by a discriminant analysis (DA) in order to study intergroup information. DA generates jackknife validations (JV) based on half of the samples and leave-one-out cross-validations (CV) for each sample to test cluster robustness. Then, DA identifies the most explicative variables for an a priori clustering on the basis of correlation coefficients (Pearson) between variables and coordinates. According to the hypothesis of site clonality, DA was first generated on individual samples, and then on the site means in order to reinforce specific features and to improve the clarity of DA representation. Box-and-whisker plots were generated for each variable to reveal size overlaps between *Arundo* species. All these analyses were performed with ade4 and MASS R-packages (Venables & Ripley, 2002).

All qualitative morphological features mentioned in Floras (Rouy, 1913; Coste, 1937; Fiori, 1969; Tutin & al., 1980; Davis & al., 1985; Feinbrun-Dothan, 1986; Bolos & Vigo, 2001) and other literature (Danin & al., 2002, 2005; Danin, 2004; Danin & Naenny, 2008) were observed, and we retained the most discriminant features delimiting taxonomic clusters. In addition, we searched for new features useful for identification in the field and of herbarium specimens. Only the most reliable of them were included in the new determination key and illustrated with Scanning Electron Microscopy (PRATIM, Aix-Marseille University).

RESULTS

Genetic differentiation. — The six AFLP primer pairs generated 1046 fragments (from 141 to 208 each one), of which 83% were polymorphic. The threshold delimiting MLLs (i.e., the maximum distance between pairwise controls) was assessed as 11 mismatches which corresponds to an error rate of 2%.

The three first axes of PCo represent 67% of the overall variation (respectively, 35.8%, 26.9% and 5.2%) and clearly discriminate five clusters (Fig. 1A–B) corresponding to *A. formosana*, *A. donax*, and to three clusters within *A. plinii* s.l.: a circum-Mediterranean cluster (*A. micrantha*), and a second group divided by the third principal coordinate into an Italian-Balkan (*A. plinii* s.str.) and a Franco-Ligurian (*A. donaciformis*) cluster (see Taxonomic treatment). Using 35 principal components, model selection and the K-means method, the DAPC supports the consistency of five clusters (Fig. 1C). The exact (100%) reassignment of all samples strongly confirms the cohesion and the differentiation of each.

In the Mediterranean Basin, *A. plinii* s.str. stands apart by having a higher number of fragments ($F = 787$; Table 1), linked to a much higher polymorphism rate (%P = 50.1%) and higher genetic diversity ($D = 0.132$, MLL = 37). In contrast, *A. donax*, *A. micrantha* and *A. donaciformis* have unexpectedly and dramatically low diversity indices ($D < 0.01$), with only one MLL per taxon. These three taxa do not form Caryopses but show higher rhizome survival rates than the fertile *A. plinii* s.str. (86%–90% vs. 51%; Table 1). Even with only one sample, *A. formosana* has the highest number of specific markers (SF = 101).

Morphological traits. — In the morphometric analysis, the first axis of PCA (48.6%) clearly shows the morphological differentiation of *A. donax* in the Mediterranean (Fig. 2). Within the *A. plinii* s.l. complex, three groups appear which are relatively congruent with the clusters revealed by AFLPs: (1) *A. plinii* s.str., (2) *A. donaciformis* and (3) *A. micrantha*. Although these three taxa overlap, CV and holdout validations on morphometric data both reassign 97.5% of samples according to the molecular clustering assignment. The DA generated from

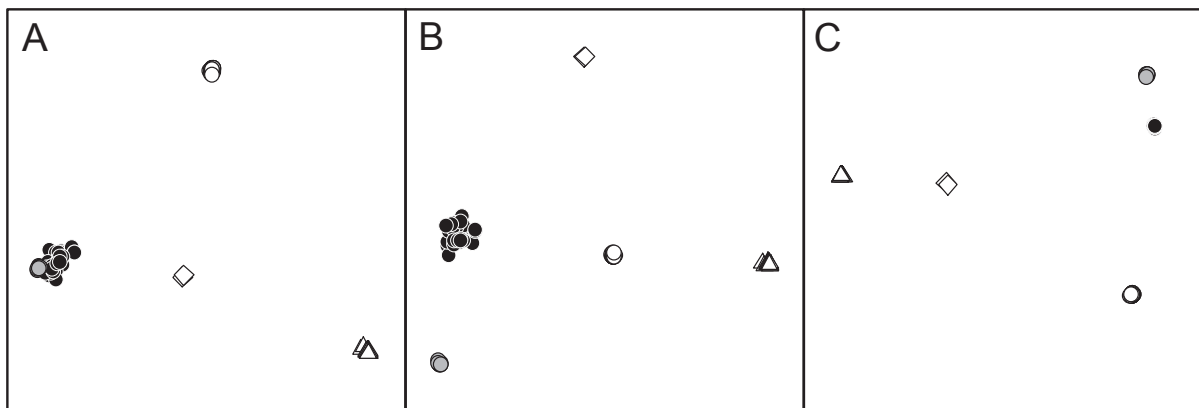


Fig. 1. Analysis of AFLP data of one sample of *A. formosana* (diamond), 16 samples of *A. donax* (triangles) and 79 samples of *A. plinii* s.l. (circles). White circles, *A. micrantha* ($n = 30$); grey circles, *A. donaciformis* ($n = 8$); black circles, *A. plinii* s.str. ($n = 41$). **A**, principal coordinates (PCo) analysis of Jaccard distances between samples, axis 1 (35.8%) and axis 2 (26.9%); **B**, PCo axis 1 (35.8%) and axis 3 (5.2%); **C**, discriminant analysis of principal components (axis 1: 59.5%; axis 2: 22.3%).

Table 1. Descriptive statistics based on AFLP data, reproductive strategy index and chromosome numbers.

| | n | F | SF | %P | D | MLL | %R | %S | 2n ^a |
|---------------------------|----|-----|-----|------|-------|-----|----------|----------|--------------------------|
| <i>Arundo plinii</i> s.l. | | | | | | | | | |
| <i>A. plinii</i> s.str. | 41 | 787 | 78 | 50.1 | 0.132 | 37 | 51 (343) | 12 (495) | 72–76 (17) |
| <i>A. donaciformis</i> | 8 | 542 | 0 | 2.0 | 0.007 | 1 | 86 (113) | 0 (210) | 108 (21) |
| <i>A. micrantha</i> | 30 | 599 | 20 | 5.3 | 0.006 | 1 | 88 (189) | 0 (255) | 72 (11) |
| <i>Arundo donax</i> | 16 | 570 | 57 | 4.4 | 0.008 | 1 | 90 (122) | 0 (165) | ca. 108 ^b (9) |
| <i>Arundo formosana</i> | 1 | 563 | 101 | – | – | – | – | – | 72 (2) |

Column headers are as follows: n, number of samples; F, number of fragments; SF, number of specific fragments; %P, percentage of polymorphic fragments; D, Nei’s genetic diversity index; MLL, number of multi-locus lineages; %R, survival percentage of cultivated rhizomes; %S, percentage of seed production; 2n, chromosome numbers from Pizzolongo (1962), Gorenflot & al. (1972), Hardion & al. (2011) and our unpublished data.

^aNumber of sites studied in parentheses.

^bIn the Mediterranean.

site means clearly distinguishes the three clusters of *A. plinii* s.l. (Fig. 3). The first axis (74.4%) is positively correlated with vegetative characters and discriminates the *A. micrantha* cluster from the two others. The second axis (25.6%) is explained by spikelet variables and discriminates *A. donaciformis*.

Box-and-whiskers plots clearly illustrate the amplitude of all morphometric characters (Fig. 4), and the greater size of *A. donax* in almost all variables, except for rhizome internode length (eR). Within the *A. plinii* s.l. complex, *A. micrantha* has the most robust vegetative parts, *A. donaciformis* has the longest floral organs, and *A. plinii* s.str. has the smallest values for all morphometric variables, except eR.

Since morphometric characters are strongly overlapping, eight (including five new ones) discriminant qualitative features, relating to rhizome, flower number by spikelet, and indumentum of culms, leaves and spikelets, have been selected for the determination key (Fig. 5; Taxonomic treatment).

■ DISCUSSION

Systematics and distribution of *Arundo* taxa. — On the basis of Mediterranean-wide samples and a molecular and morphometric approach, our study revealed the existence of

five taxa which are better discriminated by AFLP fingerprinting than by morphometry due to character overlap. As the Taiwanese *A. formosana* and the cosmopolitan *A. donax* are well differentiated, the taxonomic challenge in *Arundo* is to distinguish taxa within *A. plinii* s.l. Despite its coherence supported by the lemma plinii-type (i.e., lemma with hairs horizontally inserted on a ring upon its first quarter; Fig. 5C) and 1(2)-flowered spikelets, our data imply the division of this group into three distinct taxa (Fig. 6): (1) the circum-Mediterranean *A. micrantha*, (2) the Italo-Balkan *A. plinii* s.str. (3)

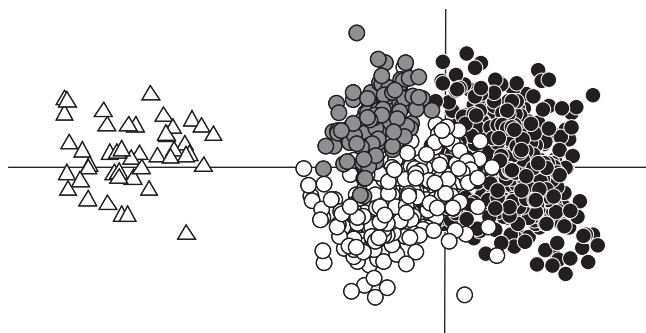


Fig. 2. Principal component analysis based on 14 morphological characters and 930 individuals of *A. plinii* s.l. (circles) and 45 of *A. donax* (triangles). Circle colours indicate the clustering by AFLP fingerprints (Fig. 2). The first two axes explain 48.6% and 10.9% of total variation, respectively. White circles, *A. micrantha* (n = 270); grey circles, *A. donaciformis* (n = 105); black circles, *A. plinii* s.str. (n = 555).

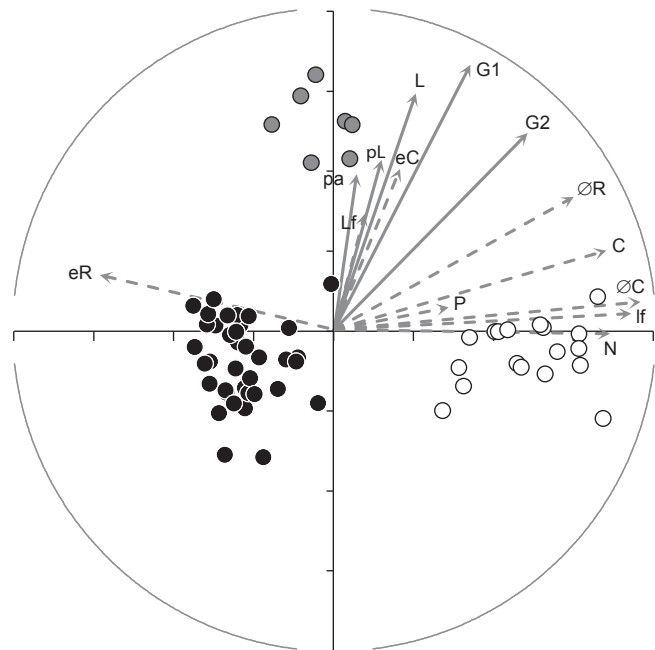


Fig. 3. Discriminant analysis (74.4% and 25.6%) based on the mean values of the 62 sites of *A. plinii* s.l. for 14 morphological characters. White circles, *A. micrantha* (n = 18); grey circles, *A. donaciformis* (n = 7); black circles, *A. plinii* s.str. (n = 37). Vegetative characters (dashed arrows): height of culm with panicle (C), node number/culm (N), internode length (eC), culm basal diameter (ØC), panicle length (P), rhizome internode length (eR) and diameter (ØR), length (Lf) and width (lf) of the leaf blade. Spikelet characters (solid arrows): lengths of lower (G1) and upper (G2) glumes, lemma (L), palea (pa) and lemma hairs (pL).

and the Franco-Ligurian *A. donaciformis*. Their morphological, geographical and genetic characteristics justify the chosen specific rank, reinforced by the absence of interspecific hybrids (Sites & Marshall, 2003; Crawford & al. 2005). Moreover, our results are in accordance with chromosome data from the literature (Hardion & al., 2011) showing a higher ploidy level for *A. donaciformis* ($2n = 108$; Table 1).

While *A. micrantha* is a synonym of *A. mediterranea* Danin, *A. plinii* s.str. and *A. donaciformis* clearly differ from the taxa proposed by Danin (2004). In contrast to previous studies (Danin 2004; Mariani & al., 2010), no genetic or morphological difference between samples from Bologna and the remaining Italo-Balkan samples supports the distinction of *A. collina* Ten. (locus classicus: Napoli) from *A. plinii* s.str. (locus classicus: Bologna): both taxa belong to the same species. We tested and rejected the only character supporting *A. collina* in Danin’s key, “lemma with entire apex”, because this feature is too variable and barely visible.

Relationships between genetic diversity, fertility and polyploidy. — This study reveals a high correlation between genetic diversity, fertility and polyploidy in *Arundo* (Table 1).

In the literature, fruit formation has been reported only for $2n = 72$ cytotypes: *A. formosana*, Asian *A. donax* ($2n = ca. 72$ in Thailand: Larsen, 1963; India: Christopher & Abraham, 1971; Mehra & Chaudhary, 1975; Uzbekistan: Bochantseva, 1972; fertile in Iran: Bor, 1970; China: Wu & Raven, 1994; Pakistan: Brach & Song, 2006), and *A. plinii* s.str. (Hardion & al., 2011). In contrast, with $2n = ca. 108$ (e.g., Gorenflot & al., 1972; Hardion & al., 2011), Mediterranean *A. donax* and *A. donaciformis* do not show fructification or genetic variation. The most parsimonious hypothesis to explain the formation of $2n = 108$ is the fusion of reduced ($n = 36$) and unreduced ($n = 72$) gametes from diploidized progenitors ($2n = 72$). This event produces pseudotriploids which are often sterile due to strong meiotic irregularities (Thompson & Lumaret, 1992; Bretagnolle & Thompson, 1995). Polyploid formation frequently occurs on

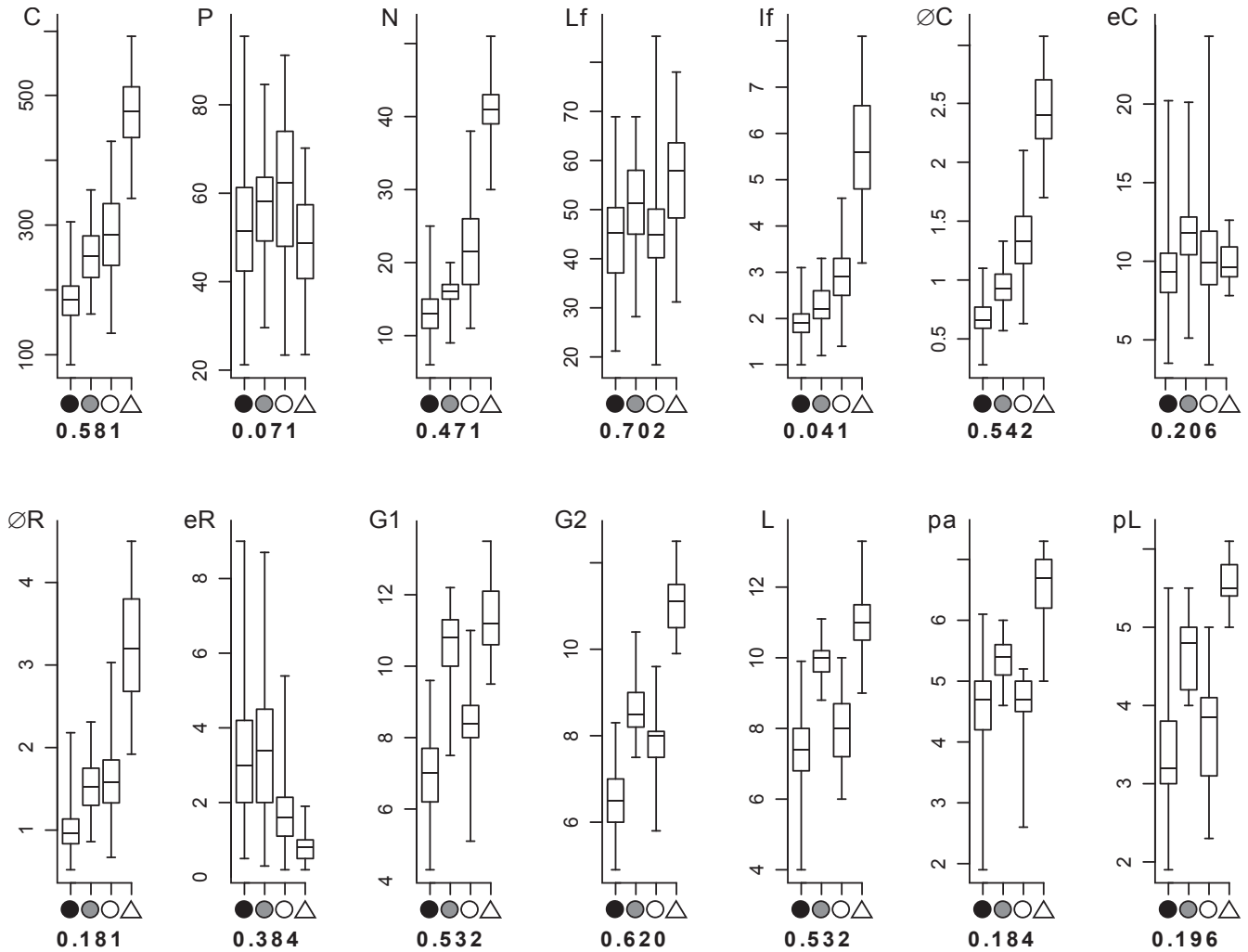


Fig. 4. Box-and-whiskers plots of morphological variables measured on 930 samples of *A. plinii* s.l. (circles) and 45 samples of *A. donax* (triangles). Bold numbers indicate R^2 values between *A. plinii* s.l. clusters. White circles, *A. micrantha* ($n = 270$); grey circles, *A. donaciformis* ($n = 105$); black circles, *A. plinii* s.str. ($n = 555$). Variables from left to right, top row: Height of culm with panicle (C), panicle length (P), node number/culm (N), length (Lf) and width (lf) of the leaf blade, culm basal diameter ($\varnothing C$), internode length (eC); bottom row: rhizome diameter ($\varnothing R$) and internode length (eR), lengths of lower (G1) and upper (G2) glumes, lemma (L), palea (pa) and lemma hairs (pL).

the edge of a species' distribution area (Soltis & al. 2007), such as in *A. donaciformis* at the northwest edge of the range of the diploidized *A. plinii* s.str., or in Mediterranean *A. donax* at the western edge of its Asian range.

With a single MLL in the Mediterranean Basin, origin and dispersal of non-fructiferous *A. donax* and *A. micrantha* raise challenging questions. Such genetic uniformity has rarely been observed in widespread native species, e.g., *Spartina maritima* (Curtis) Fernald (Raybould & al., 1991; Yannic & al., 2004), but more frequently in invasive taxa, such as *Pennisetum setaceum* (Forssk.) Chiov. (Poulin & al., 2005; Le Roux & al., 2007), *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr. (Hollingsworth & Bailey, 2000), *Spartina anglica* C.E. Hubb. (Baumel & al., 2001) or *A. donax* in the U.S.A. (Ahmad & al., 2008). In case of *A. donax*, an ancient introduction (as an archaeophyte) to the Mediterranean Basin, linked to drastic founder effects (Dlugosch & Parker, 2008), could explain its genetic uniformity in this area. In contrast to *A. donax* in the Mediterranean area, the species shows AFLP genotype variation in Asia (Mariani & al. 2010). On the other hand, the sterility of *A. micrantha* and its lack of genetic diversity remain more enigmatic given its ploidy level ($2n = 72$) and its restriction to the Mediterranean Basin. In conclusion, the systematics and evolution of *Arundo* needs further investigations in western Asia.

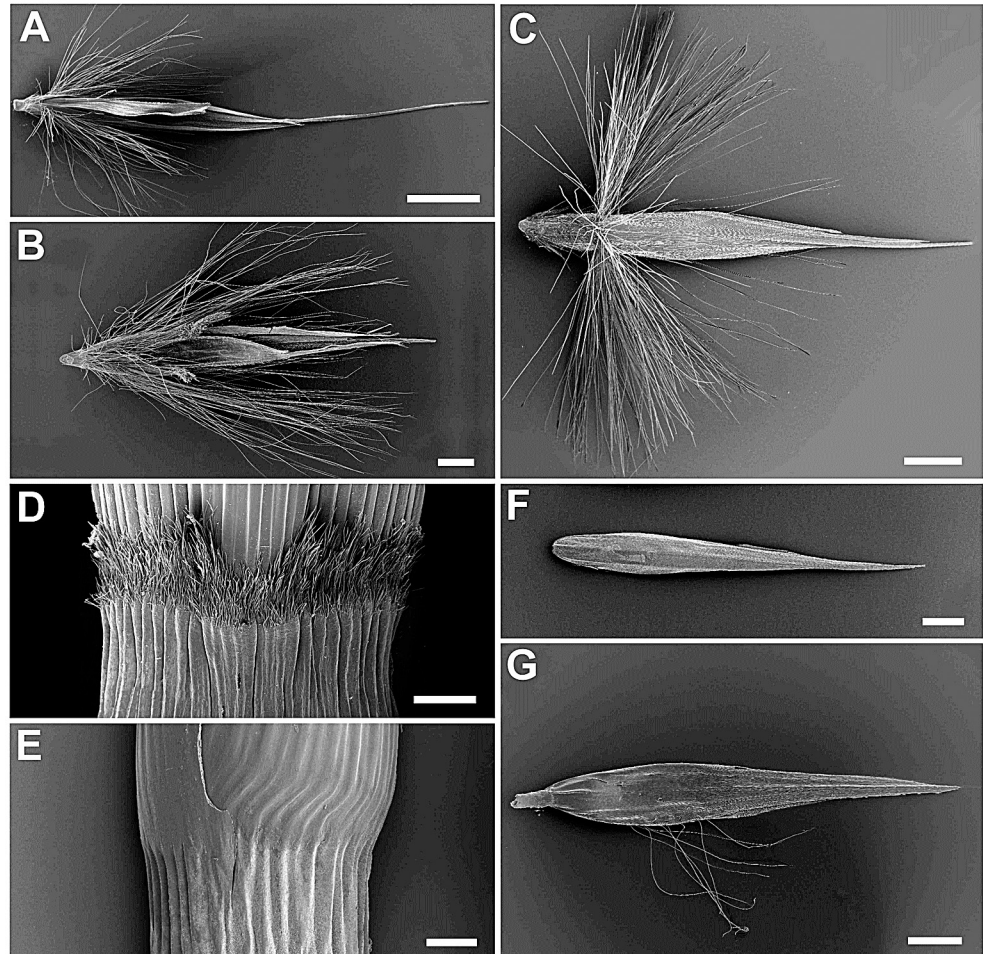
■ TAXONOMIC TREATMENT

Key to species of the genus *Arundo*:

1. Lemma with hairs obliquely spread on its lower quarter, spikelets with 3–5 florets 2
1. Lemma with hairs perpendicularly inserted on a ring on its first quarter; spikelets with 1(2) florets 3
2. Stems erect, rhizome tuberous with internodes <1cm, glumes, nodes, limbs and sheaths glabrous *A. donax*
2. Stems decumbent, rhizome stem-like, glumes and nodes glabrous, sheaths and limbs hairy *A. formosana*
3. Culms erect, rhizomes stem-like, nodes, sheaths, limbs and glumes glabrous..... *A. micrantha*
3. Culms erect, rhizomes stem-like, nodes pubescent, sheaths and limbs glabrous 4
4. Upper glumes glabrous *A. plinii* s.str.
4. Upper glumes hairy *A. donaciformis*

Arundo donaciformis (Loisel.) Hardion, Verlaque & B. Vila, **comb. nov.** ≡ *Calamagrostis donaciformis* Loisel., Fl. Gall., ed. 2, 1: 53. 1828 – Holotype: France. Fréjus, *Perreymond s.n.* (AV!; isotype: MARS [no. MARS00004]!). This rare taxon from southern France and Liguria was

Fig. 5. Discriminant morphological characters in *Arundo* (SEM). **A**, lemma of *A. formosana*; **B**, lemma of *A. donax*; **C**, lemma of *A. donaciformis*; **D**, pubescent node of *A. donaciformis*; **E**, glabrous node of *A. micrantha*; **F**, glabrous upper glume of *A. plinii* s.str.; **G**, hairy upper glume of *A. donaciformis*. — All scale bars = 1 mm.



already described from Fréjus by Jean-Louis-Auguste Loiseleur-Deslongchamps as a *Calamagrostis* species because of its 1-flowered spikelet.

Arundo plinii Turra, Farsetia: 11. 1765 ≡ *Calamagrostis plinii* (Turra) J.F. Gmel., Syst. Nat. 1: 172. 1796 ≡ *Donax plinii* (Turra) K. Koch, Dendrologie 2(2): 352. 1873 ≡ *Arundo donax* subsp. *plinii* (Turra) Mateo & R. Figuerola in Fl. Analit. Prov. Valencia (I.A.M. Investig. 14): 368. 1987–**Neotype (designated here)**: Italy. Bologna, On the banks of the Reno, *Hardion s.n.* (MARS [no. MARS00005]!); isoneotypes: BM!, E!, K!, P!).

= *Arundo collina* Ten., Fl. Napol. 3: 101. 1822 – **Lectotype (designated here)**: Italy. In collibus neapolis, *Tenore s.n.* (MARS [no. MARS00006]!).

= *Arundo hellenica* Danin, Raus & H. Scholz in Willdenowia 32: 191. 2002 – Holotype: Greece. Sterea Ellas, Nomos of Viotia, 2 km West of Livadia, 10 m off the road, clayey rock outcrop, 3 Nov 2000, *Danin G2000/09/16N* (HUI; isotypes: B!, E!).

Arundo micrantha Lam., Tabl. Encycl. 1: 196. 1791 – Holotype: Africa, *Desfontaines s.n.* (P-LA!; isotypes: B!, G!, K!, MPU!, P!).

= *Arundo mauritanica* Desf., Fl. Atlant. 1: 106. 1798, nom. illeg., non Poir. 1789 ≡ *Calamagrostis mauritanica* Spreng., Syst. Veg. 1: 252. 1825 – Holotype: Algeria, *Desfontaines s.n.* (P!; isotypes: B!, G!, K!, MPU!, P-LA!).

= *Arundo mediterranea* Danin in Willdenowia 34: 362. 2004 – Holotype: Israel, Nahal Sorek, 18 Sep 2004, *Danin s.n.* (HUI; isotypes: B!, E!, MARS [no. MARS00007]!).

Arundo formosana Hack. in Bull. Herb. Boissier 7(9): 724. 1899 – Holotype: Taiwan. Shinchiku, 24 Nov 1896, *Makino 322* (W; isotype: US).

= *Arundo parviflora* Ohwi in Repert. Spec. Nov. Regni Veg 36: 40. 1934 – Holotype: Japan. Shikoku, Mai 1933, *Ohwi 1597* (US).

Arundo donax L., Sp. Pl. 1: 81. 1753 1753 ≡ *Cynodon donax* (L.) Raspail in Ann. Sci. Nat., Bot. 5: 302. 1825 ≡ *Scolochloa donax* (L.) Gaudin in Fl. Helv. 1: 202. 1828 – Lectotype (designated by Renvoize in Regnum Veg. 127: 21. 1993): Herb. A. van Royen, 912.356-93.

= *Arundo bifaria* Retz., Observ. Bot. 4: 21. 1786 ≡ *Amphidonax bifaria* (Retz.) Nees ex Steud. Syn. Pl. Glumac. 1: 197. 1854 ≡ *Donax bifarius* (Retz.) Trin. ex Spreng., Neue Entdeck. Pflanzenk. 2: 73. 1821 – Holotype: India Orientali, *König s.n.* (K!; isotype: BM!).

= *Arundo bengalensis* Retz., Observ. Bot. 5: 20. 1789 ≡ *Aira bengalensis* (Retz.) Gmel., Syst. Nat.: 174. 1791 ≡ *Donax bengalensis* (Retz.) P. Beauv., Ess. Agrostogr.: 78, 152, 161. 1812 ≡ *Amphidonax bengalensis* Roxb. ex Nees in Nat. Syst. Bot.: 449. 1836 ≡ *Amphidonax bengalensis* (Retz.) Nees ex Steud., Syn. Pl. Glumac. 1: 197. 1854, hom. illeg. – Holotype: India, Bengala, *König s.n.* (LD).

= *Arundo donax* var. *coleotricha* Hack. in Bull. Herb. Boissier 7: 724. 1899 ≡ *Arundo coleotricha* (Hack.) Honda in Bot. Mag. (Tokyo) 41: 14. 1927 – Holotype: Taiwan, Tamsui, *Makino 343* (TI).

■ ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to all collectors of *Arundo* specimens used in this study. The help of staff at all visited (BM, E, G, K, MPU, P) or contacted herbaria is also gratefully acknowledged. The authors thank Pr. Avinoam Danin and Dr. Fabrizio Grassi for their contribution, and H.P. Comes and two anonymous reviewers for their extensive comments. This work is included in the Programme Interdisciplinaire de

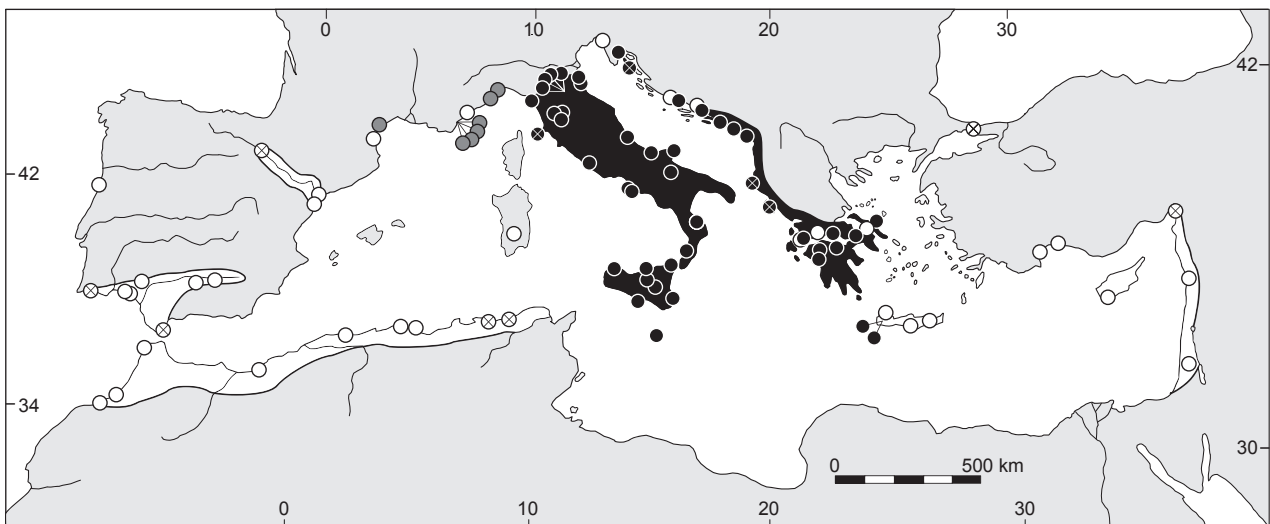


Fig. 6. Origin of samples (circles) and estimated distribution areas of *A. micrantha* (white), *A. donaciformis* (grey) and *A. plinii* s.str. (black) in the Mediterranean Basin according to AFLP fingerprints and morphology. Crossed circles indicate herbarium samples not included in the AFLP analysis (Appendix).

Recherche Ville-Environnement financed by the CNRS, the Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, du Transport et du Logement, the DREAL PACA. The authors are also grateful for other financial support provided by the Fédération de Recherche ECCOREV and the Société Botanique de France.

■ LITERATURE CITED

- Ahmad, R., Liow, P.S., Spencer, D.F. & Jasieniuk, M. 2008. Molecular evidence for a single genetic clone of invasive *Arundo donax* in the United States. *Aquatic Bot.* 88: 113–120.
- Barker, N.P., Linder, H.P. & Harley, E.H. 1995. Polyphyly of Arundinoideae (Poaceae): Evidence from *rbcL* sequence data. *Syst. Bot.* 20: 423–435.
- Barker, N.P., Linder, H.P. & Harley, E.H. 1999. Sequences of the grass-specific insert in the chloroplast *rpoC2* gene elucidate generic relationships of the Arundinoideae (Poaceae). *Syst. Bot.* 23: 327–350.
- Baumel, A., Ainouche, M.L. & Lévassieur, J.E. 2001. Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). *Molec. Ecol.* 10: 1689–1701.
- Bochantseva, Z.P. 1972. O chislakh chromosom. *Introd. Akklim. Rast. Akad. Nauk Uzbeksk. S.S.R.* 3: 45–53.
- Bolos, O. De & Vigo, J. 2001. *Flora dels Països Catalans*, vol. 4. Barcelona: Ed. Barcino.
- Bor, N.L. 1970. *Gramineae*. Vol. 20 of: Rechinger, K.H. (ed.), *Flora Iranica*. Graz: Akademische Druck- und Verlagsanstalt.
- Brach, A.R. & Song, H. 2006. eFloras: New directions for online Floras exemplified by the Flora of China project. *Taxon* 55: 188–192.
- Bretagnolle, F. & Thompson, J.D. 1995. Gametes with the stomatic chromosome number: Mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol.* 129: 1–22.
- Callmander, M.W., Schatz, G.E. & Lowry, P.P. 2005. IUCN red list assessment and the global strategy for plant conservation: Taxonomists must act now. *Taxon* 54: 1047–1050.
- Christopher, J. & Abraham, A. 1971. Studies on the cytology and phylogeny of South Indian grasses. I. Subfamilies Bambusoideae, Oryzoideae, Arundinoideae and Festucoideae. *Cytologia* 36: 579–594.
- Conert, H.J. 1961. *Die Systematik und Anatomie der Arundinae*. Weinheim: J. Cramer.
- Coste, H. 1937. *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes*, vol. 3. Paris: Librairie des Sciences et des Arts.
- Crawford, D.J., Mort, M.E. & Archibald, J.K. 2005. Biosystematics, chromosomes and molecular data: Melding the old and the new. *Taxon* 54: 285–289.
- Danin, A. 2004. *Arundo* (Gramineae) in the Mediterranean reconsidered. *Willdenowia* 34: 361–369.
- Danin, A. & Naenny, W. 2008. Contribution to the recognition of reeds by their rhizome anatomy. *Fl. Medit.* 18: 385–392.
- Danin, A., Domina, G. & Raimondo, F.M. 2005. Prime osservazioni ecologico-distributive su *Arundo collina* Ten. (Poaceae) in Italia. *Inform. Bot. Ital.* 37(2): 1167–1170.
- Danin, A., Raus, T. & Scholz, H. 2002. Contribution to the Flora of Greece: A new species of *Arundo* (Poaceae). *Willdenowia* 32: 191–194.
- Davis, P.H. 1985. *Flora of Turkey*, vol. 9. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Després, L., Gielly, L., Redoutet, B. & Taberlet, P. 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molec. Phylog. Evol.* 27: 185–196.
- De Witte, L.C., Armbruster, G.F.J., Gielly, L., Taberlet, P. & Stöcklin, J. 2012. AFLP markers reveal high clonal diversity and extreme longevity in four key arctic-alpine species. *Molec. Ecol.* 21: 1081–1097.
- Dlugosch, K.M. & Parker, I.M. 2008. Founding events in species invasions: Genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molec. Ecol.* 17: 431–449.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
- Ehrlich, D. 2006. AFLPDAT: A collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molec. Ecol. Notes* 6: 603–604.
- Feinbrun-Dothan, N. 1986. *Flora Palaestina*, vol. 4. Jerusalem: Israel Academy of Sciences and Humanities.
- Figureiral, I., Bouby, L., Buffat, L., Petitot, H. & Terral, J.-F. 2010. Archaeobotany, vine growing and wine producing in Roman southern France: The site of Gasquinoy (Béziers, Hérault). *J. Archaeol. Sci.* 37: 139–149.
- Fiori, A. 1969. *Nuova Flora Analitica d'Italia*, vol. 1. Bologna: Ed. Agricole.
- Gorenflot, R., Cartier, D. & Raicu, P. 1972. Caryologie de la canne de Provence (*Arundo donax* L.). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Sér. D* 274: 391–393.
- Govaerts, R. 1999. *World checklist of seed plants*, vol. 3, pt. 1. Antwerp: Continental Publishing.
- Grassi, F., Mariani, C., Zecca, G. & Soave, C. 2008. Nuclear and chloroplast DNA variability in *Arundo* (Arundinoideae). Poster Abstract A.44. in: *Proceedings of the 52nd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress*. http://www.siga.unina.it/SIGA2008/SIGA_2008/A_44.pdf.
- Grass Phylogeny Working Group 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 88: 373–457.
- Hardion, L., Verlaque, R., Callmander, M.W. & Vila, B. 2012. *Arundo micrantha* Lam. (Poaceae), the correct name for *Arundo mauritanica* Desf. and *Arundo mediterranea* Danin. *Candollea* 67: 131–135.
- Hardion, L., Verlaque, R., Fridlender, A. & Vila, B. 2011. *Arundo*. In: Marhold, K. (ed.), IAPT/IOPB chromosome data 11. *Taxon* 60: 1221, E6.
- Hollingsworth, M.L. & Bailey, J.P. 2000. Evidence for massive clonal growth in the invasive weed *Fallopia japonica* (Japanese Knotweed). *Bot. J. Linn. Soc.* 133: 463–472.
- Jiménez-Mejías, P., Escudero, M., Guerra-Cárdenas, S., Lye, K.A., & Luceño, M. 2011. Taxonomic delimitation and drivers of speciation in the Ibero-North African *Carex* sect. *Phacocystis* river-shore group (Cyperaceae). *Amer. J. Bot.* 98: 1855–1867.
- Jombart, T., Devillard, S. & Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *B. M. C. Genet.* 11: 94, doi: 10.1186/1471-2156-11-94.
- Koopman, W.J.M. 2005. Phylogenetic signal in AFLP data sets. *Syst. Biol.* 54: 197–217.
- Lambertini, C., Gustafsson, M., Frydenberg, J., Lissner, J., Speranza, M. & Brix, H. 2006. A phylogeographic study of the cosmopolitan genus *Phragmites* (Poaceae) based on AFLPs. *Pl. Syst. Evol.* 258: 161–182.
- Lamote, V., De Loose, M., Van Bockstaele, E. & Roldán-Ruiz, I. 2005. Evaluation of AFLP markers to reveal genetic diversity in *Typha*. *Aquatic Bot.* 83: 296–309.
- Larsen, K. 1963. Studies in the flora of Thailand. 14. Cytological studies in vascular plants of Thailand. *Dansk Bot. Ark.* 20: 211–275.
- Le Roux, J.J., Wicczorek, A.M., Wright, M.G. & Tran, C.T. 2007. Super-genotype: Global monoclonality defies the odds of nature. *PLoS ONE* 2(7): e590, doi: 10.1371/journal.pone.0000590.
- Linder, H.P., Verboom, G.A. & Barker, N.P. 1997. Phylogeny and evolution in the *Crinipes* group of grasses (Arundinoideae: Poaceae). *Kew Bull.* 52: 91–110.
- Mariani, C., Cabrini, R., Danin, A., Piffanelli, P., Fricano, A., Gomarasca, S., Dicandilo, M., Grassi, F. & Soave, C. 2010. Origin, diffusion and reproduction of the giant reed (*Arundo donax* L.): A promising weedy energy crop. *Ann. Appl. Biol.* 157: 191–202.

- Mehra, P.N. & Chaudhary, J.D.** 1975. In: Löve, A. (ed.), IOPB chromosome number reports 47. *Taxon* 24: 511.
- Na, H.R., Kim, C. & Choi, H.-K.** 2010. Genetic relationship and genetic diversity among *Typha* taxa from East Asia based on AFLP markers. *Aquatic Bot.* 92: 207–213.
- Olivier, L., Galland, J.-C., Maurin, H. & Roux, J.-P.** 1995. *Livre rouge de la Flore menacée de France*, vol. 1, *Espèces prioritaires*. Paris: Collection patrimoines naturels.
- Pizzolongo, P.** 1962. Osservazione cariologiche su *Arundo donax* L. e *Arundo plinii* Turra. *Ann. Bot. (Rome)* 27: 173–188.
- Poulin, J., Weller, S.G. & Sakai, A.K.** 2005. Genetic diversity does not affect the invasiveness of fountain grass (*Pennisetum setaceum*) in Arizona, California and Hawaii. *Diversity & Distrib.* 11: 241–247.
- Prat, H.** 1932. L'épiderme des Graminées. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, sér. 10, 14: 117–324.
- Raybould, A.F., Gray, A.J., Lawrence, M.J. & Marshall, D.F.** 1991. The evolution of *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Gramineae): Origin and genetic variability. *Biol. J. Linn. Soc.* 43: 111–126.
- R Development Core Team** 2010. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R foundation for statistical computing.
- Renvoize, S.** 1981. The subfamily Arundinoideae and its position in relation to general classification of the Gramineae. *Kew Bull.* 36: 85–102.
- Rouy, G.** 1913. *Flore de France*, vol. 14. Paris: Les Fils d'Emile Deyrolle.
- Sites, J.W., Jr. & Marshall, J.C.** 2003. Delimiting species: A renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* 18: 462–470.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Schemske, D.W., Hancock, J.F., Thompson, J.N., Husband, B.C. & Judd, W.S.** 2007. Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56: 13–30.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. & Olivier, J.-M.** 1997. ADE-4: A multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7: 75–83.
- Thompson, J.D. & Lumaret, R.** 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: Origins, establishment and persistence. *Trends Ecol. Evol.* 7: 302–307.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. & Webb, D.A.** 1980. *Flora Europaea*, vol. 5. Cambridge: Cambridge University Press.
- Venables, W.N. & Ripley, B.D.** 2002. *Modern applied statistics with S*, 4th ed. New York: Springer.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M.** 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407–4414.
- Wu, Z.Y. & Raven, P.H.** 1994. *Flora of China*, vol. 22. Beijing: Beijing Science Press.
- Yannic, G., Baumel, A. & Ainouche, M.** 2004. Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* (Poaceae), a salt-marsh species in decline along the Western European Coast. *Heredity* 93: 182–188.
- Zhang, W., Wendel, J.F. & Clark, L.G.** 1997. Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Molec. Phylogen. Evol.* 8: 205–217.

Appendix. List of samples studied and included in morphometry and AFLP analyses.

| Taxon | Post treatment | Locality, collector, voucher | Metric | AFLP |
|-----------------------|------------------------|---|--------|------|
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Chypre, Limassol, <i>Constantinou</i> , MARS00046 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Croatia, Pag, 44°30'42"N, 14°56'03"E, <i>Fridlender</i> , MARS00047 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | France, Bonifacio, 41°24'04"N, 9°10'13"E, <i>Verlaque</i> , MARS00048 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | France, Marseille, 43°20'04"N, 5°08'26"E, <i>Verlaque</i> , MARS00049 | + | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Greece, Kolimpari, 35°32'11"N, 23°47'30"E, <i>Vila</i> , MARS00050 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Greece, Kavassilas, 37°52'34"N, 21°16'02"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00051 | + | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Italy, Volterra, 43°24'05"N, 10°59'53"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00052 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Italy, Napoli, 40°53'50"N, 14°02'38"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00053 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Italy, Cannitello, 38°13'48"N, 15°38'58"E, <i>Hardion</i> , MARS00054 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Lebanon, Jadra, 33°38'03"N, 35°24'01"E, <i>Abdel Samad</i> , MARS00055 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Malta, Marsaskala, 35°50'48"N, 14°33'51"E, <i>Médail & Gambin</i> , MARS00056 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Morocco, Rabat, 34°01'46"N, 6°44'20"W, <i>Hardion</i> , MARS00057 | + | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Portugal, Figueira da foz, 40°12'19"N, 8°53'56"W, <i>Engels</i> , MARS00058 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Spain, Bonares, 37°20'39"N, 6°40'37"E, <i>Hardion</i> , MARS00059 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Spain, Amposta, 40°42'20"N, 0°35'55"E, <i>Hardion</i> , MARS00060 | | + |
| <i>A. donax</i> | <i>A. donax</i> | Tunisia, Sidi bou said, 36°52'00"N, 10°20'36"E, <i>Hardion</i> , MARS00061 | | + |
| <i>A. formosana</i> | <i>A. formosana</i> | Taiwan, <i>Lyonnet</i> , MARS00045 | | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. donaciformis</i> | France, Fréjus, 43°25'55"N, 6°45'52"E, <i>Hardion</i> , MARS00062 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. donaciformis</i> | France, Saint Raphaël, 43°27'47"N, 6°47'52"E, <i>Hardion</i> , MARS00063 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. donaciformis</i> | France, Puget/Argens, 43°26'38"N, 6°42'28"E, <i>Hardion</i> , MARS00064 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. donaciformis</i> | France, Les Arcs, 43°27'09"N, 6°31'13"E, <i>Hardion</i> , MARS00065 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. donaciformis</i> | France, Lespignan, 43°16'36"N, 3°09'03"E, <i>Hardion</i> , MARS00066 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. donaciformis</i> | Italy, Cervo, 43°55'38"N, 8°07'37"E, <i>Hardion</i> , MARS00067 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. donaciformis</i> | Italy, Andorra, 43°57'49"N, 8°10'00"E, <i>Hardion</i> , MARS00068 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. donaciformis</i> | Italy, Finale Ligure, 44°10'39"N, 8°22'12"E, <i>Hardion</i> , MARS00069 | | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Algeria, Tipasa, 36°35'34"N, 2°27'24"E, <i>Baumel</i> , MARS00070 | | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Algeria, Tizi Ouzou, 36°52'13"N, 4°02'48"E, <i>Ait-Saïd</i> , MARS00071 | | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Algeria, Tlemcen, 35°17'10"N, 1°27'51"W, <i>Youssef</i> , MARS00072 | | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Algeria, Sidi Aich, 36°35'00"N, 4°39'00"E, <i>Vela</i> , MARS00073 | | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Algeria, Bône, <i>Tribout</i> , P02620644 | | |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Algeria, La Calle, <i>Lefranc</i> , P02620659 | | |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Chypre, Limassol, <i>Constantinou</i> , MARS00074 | | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Croatia, Ploce, 43°02'56"N, 17°28'43"E, <i>Hardion</i> , MARS00138 | | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Croatia, Split, 43°31'42"N, 16°30'07"E, <i>Hardion</i> , MARS00136 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | France, Golfe Juan, 43°33'48"N, 7°04'08"E, <i>Hardion</i> , MARS00075 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | France, Ste Lucie, 43°3'25", 3°1'51", <i>Argagnon, Michaud & Molina</i> , MARS00076 | | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Greece, Kissamos, 35°29'46"N, 23°38'57"E, <i>Vila</i> , MARS00077 | + | + |

Appendix. Continued.

| Taxon | Post treatment | Locality, collector, voucher | Metric | AFLP |
|-----------------------|-------------------------|--|--------|------|
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Greece, Mires, 35°04'05"N, 24°47'06"E, <i>Vila</i> , MARS00078 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Greece, Mirtos, 35°00'21"N, 25°35'16"E, <i>Vila</i> , MARS00079 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Greece, Vassilikio, 38°25'29"N, 23°39'31"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00080 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Greece, Messolonghi, 38°22'42"N, 21°28'37"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00081 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Greece, Itea, 38°26'14"N, 22°25'25"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00082 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Italy, Trieste, 45°45'02"N, 13°39'16"E, <i>Hardion</i> , MARS00083 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Italy, Sanluri, 39°32'08"N, 8°55'07"E, <i>Maquet, Gauthier & Bouchet</i> , MARS00084 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Lebanon, Nahr el Kalb, 33°56'39"N, 35°36'44"E, <i>Médail</i> , MARS00085 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Morocco, Tanger, 35°44'44"N, 5°53'07"W, <i>Hardion</i> , MARS00086 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Morocco, Rabat, 34°01'43"N, 6°47'42"W, <i>Hardion</i> , MARS00087 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Israel, Nahal Sorek, <i>Danin</i> , MARS0007 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Portugal, Figueira da Foz, 40°12'19"N, 8°53'56"W, <i>Engels</i> , MARS00089 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Portugal, Silves, 37°06'N, 08°22'W, <i>Pistor</i> , B | | |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Spain, Amposta, 40°41'21"N, 0°34'31"E, <i>Hardion</i> , MARS00090 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Spain, Deltebre, 40°43'44"N, 0°41'04"E, <i>Hardion</i> , MARS00091 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Spain, Jaen, 38°01'32"N, 3°54'54"W, <i>Hardion</i> , MARS00092 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Spain, Cordoba, 37°56'42"N, 4°29'50"W, <i>Hardion</i> , MARS00093 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Spain, Huelva, 37°17'06"N, 6°56'44"W, <i>Hardion & Sánchez-Gullón</i> , MARS00094 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Spain, Huelva, 37°15'02"N, 6°56'05"W, <i>Hardion & Sánchez-Gullón</i> , MARS00095 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Spain, Bonares, 37°20'39"N, 6°40'37"W, <i>Hardion</i> , MARS00096 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Spain, Zaragoza, JACA | | |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Turkey, Kumluca, 36°16'30"N, 30°24'13"E, <i>Médail</i> , MARS00097 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Turkey, Tasagil, 36°56'38"N, 31°13'16"E, <i>Médail</i> , MARS00098 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Turkey, Beilan, <i>Hausknecht</i> , G | | |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. micrantha</i> | Turkey, Constantinople, <i>Castagne</i> , G00163762 | | |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Albany, Sazan Island, 40°30'17"N, 19°16'39"E, <i>Médail</i> , MARS00088 | | |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Croatia, Brsec, 45°11'07"N, 14°14'31"E, <i>Hardion</i> , MARS00099 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Croatia, Trsteno, 42°42'17"N, 17°59'23"E, <i>Hardion</i> , MARS00137 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Croatia, Split, 43°27'53"N, 16°35'05"E, <i>Hardion</i> , MARS00139 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Croatia, Cherso, <i>Noë</i> , P02656189 | | |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Sirili, 35°29'56"N, 23°48'54"E, <i>Vila</i> , MARS00100 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Lauzakies, 35°27'54"N, 23°37'53"E, <i>Vila</i> , MARS00101 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Paralia Kimis, 38°34'16"N, 24°07'31"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00102 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Sicyone, 37°58'18"N, 22°44'32"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00103 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Kavassilas, 37°52'34"N, 21°16'02"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00104 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Patras, 38°14'26"N, 21°46'02"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00105 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Messolonghi, 38°22'42"N, 21°28'37"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00106 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Levadia, 38°24'00"N, 22°58'00"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00107 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Agios Stephanos, 38°07'30"N, 23°50'06"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00108 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Greece, Courfou, <i>Bally</i> , G | | |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Napoli, 40°50'09"N, 14°03'52"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00109 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Pozzuoli, 40°53'50"N, 14°02'38"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00110 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Candela, 41°08'41"N, 15°29'35"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00111 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Rodi Garganico, 41°55'58"N, 15°55'16"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00112 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Termoli, 41°57'55"N, 14°59'46"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00113 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Lanciano, 42°16'09"N, 14°27'04"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00114 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Ostia, 41°44'53"N, 12°15'26"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00115 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Pisa, 43°42'34"N, 10°22'32"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00116 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Montegabbro, 43°24'23"N, 11°03'01"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00117 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, San Giminiano, 43°24'05"N, 10°59'53"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00118 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Volterra, 43°23'43"N, 10°52'54"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00119 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Bologna, 44°35'07"N, 11°19'20"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00120 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Castel Maggiore, 44°37'49"N, 11°18'30"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00121 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Sasso Marconi, 44°22'20"N, 11°15'10"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00122 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Pianoro, 44°23'35"N, 11°18'59"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00123 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Forli, 44°18'28"N, 12°06'51"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00124 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Ravenna, 44°22'58"N, 12°11'34"E, <i>Hardion & Vila</i> , MARS00125 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Santo Stefano, 38°00'35"N, 14°21'38"E, <i>Hardion</i> , MARS00126 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Orto Liuzzo, 38°15'50"N, 15°28'21"E, <i>Hardion</i> , MARS00127 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Dinami, 38°33'38"N, 16°04'54"E, <i>Hardion</i> , MARS00128 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Siracusa, 37°18'31"N, 15°06'26"E, <i>Hardion</i> , MARS00129 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Enna, 37°34'44"N, 14°17'12"E, <i>Hardion</i> , MARS00130 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Agrigento, 37°36'19"N, 13°48'52"E, <i>Hardion</i> , MARS00131 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Scillato, 37°36'19"N, 13°48'52"E, <i>Hardion</i> , MARS00132 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Italy, Castellamare, 38°01'11"N, 12°53'55"E, <i>Hardion</i> , MARS00133 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Montenegro, Herceg Novi, 42°26'52"N, 18°38'35"E, MARS00140 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Montenegro, Bar, 42°06'56"N, 19°04'46"E, <i>Hardion</i> , MARS00142 | + | + |
| <i>A. plinii</i> s.l. | <i>A. plinii</i> s.str. | Malta, Girdija, 35°51'22"N, 14°24'59"E, <i>Gambin</i> , MARS00134 | + | + |

Phylogéographie d'*Arundo plinii*

et origine d'*A. donaciformis*



Synthèse et éléments de discussion

Annexes :

- **Manuscrit D** : Hardion *et al.* 2013. In Marhold (Ed.). Chromosome data 14. *TAXON*
- **Manuscrit E** : Hardion *et al.* under review. Phylogeography of *A. plinii*. *J. Biogeo*

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis*

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis*

La description d'une endémique Ligurie à aire restreinte sans diversité génétique soulève de nombreuses questions quant à la conservation de ses populations. Parmi ces interrogations, les causes de sa formation et les raisons de sa persistance constituent des informations importantes pour la conservation de l'espèce. Il paraît donc essentiel de connaître et de comprendre les processus de spéciation à l'origine d'*A. donaciformis*. Une telle absence de diversité génétique chez une endémique représente un cas original, mais non exceptionnel puisque des situations analogues ont déjà été mises en évidence. Par exemple, certains *Limonium* endémiques (souvent apomictiques) possèdent des diversités génétiques très faibles comme *L. cavanillesii* Erben, ou absentes comme *L. dufourii* (Girard) Kuntze (Plumbaginaceae ; Palacios & Gonzalez-Candelas 1997) et *L. girardianum* (Guss.) Fourr. (Baumberger, comm. pers.). Chez les Poaceae, la Ouest-Atlantique *Spartina maritima* Curtis ne présente qu'une très faible variation génétique dans le nord de son aire (Raybould *et al.*, 1991; Yannic *et al.*, 2004). Chez toutes ces espèces, l'absence de diversité génétique est à mettre en relation avec leur spéciation, leur stratégie de persistance/propagation, et plus précisément avec leur forte apomixie (*i.e.* agamospermie ou multiplication végétative intense) liée à leur haut niveau de polyploïdie limitant la reproduction sexuée.

Génétiquement et géographiquement proche de l'Italo-balkanique *A. plinii s.str.*, la canne de Fréjus s'en distingue toutefois nettement par ses caractères morphologiques et cytogénétiques. Parmi les hypothèses les plus probables expliquant la genèse d'*A. donaciformis*, on peut supposer que ce taxon soit une espèce-sœur d'*A. plinii* à divergence ancienne, ou bien un polyploïde récent inscrit dans l'évolution de cette dernière. Si la phylogéographie d'*A. plinii s.str.* nous éclairera sur l'origine d'*A. donaciformis*, elle présente aussi un intérêt tout particulier dans le contexte plus large de la biogéographie méditerranéenne. D'un point de vue biogéographique, la Ligurie constitue un point chaud régional de biodiversité (Médail & Quézel 1999), ainsi qu'un refuge quaternaire pour un grand nombre de taxons (Médail & Diadema 2009 ; Noble & Diadema 2011). Mieux comprendre la formation d'*A. donaciformis* renseignera aussi sur le rôle de cette région clé dans la conservation de la biodiversité ouest-méditerranéenne. Par ailleurs, cette étude permettra de comparer les patrons de persistance d'une endémique centre-méditerranéenne sur les deux péninsules (Italie et Balkans) qui ont joué un rôle de refuge quaternaire tout à fait majeur pour la flore européenne. Enfin, la recherche d'éventuelles connexions passées entre ces deux compartiments de biodiversité nous informera sur le rôle biogéographique du bassin Adriatique durant le Quaternaire.

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis*

Pour ces investigations, huit populations d'*A. donaciformis* et 51 d'*A. plinii* ont été analysées avec trois marqueurs génétiques distincts, incluant (i) le séquençage de cinq espaceurs chloroplastiques, soit 4590 bp, (ii) les empreintes moléculaires AFLP de deux individus par localités, générant 852 marqueurs du génome nucléaire, et (iii) le comptage des nombres chromosomiques au sein de ces 59 stations. Les analyses phylogénétiques utilisées dans cette étude se basent principalement sur des méthodes Bayésiennes (BEAST, Drummond 2006) pour les séquences d'ADN chloroplastique et sur des analyses phénétiques pour les données AFLP (Principal Coordinate analysis, NeighborNet).

Le chronogramme généré à partir des séquences chloroplastiques subdivise *A. plinii* en deux lignées dont la divergence est datée de 3,6 Ma au Pliocène moyen (fin Tertiaire), et dont la répartition ne présente aucun patron géographique net. Une de ces lignées inclue *A. donaciformis*, plaçant l'endémique ligure comme une ancienne population d'*A. plinii* à divergence péripatrique Quaternaire. En divisant l'échantillonnage en six régions biogéographiques, trois d'entre elles, la Dalmatie, la Grèce, mais surtout la Sicile, se présentent comme des zones ancestrales de persistance pour *A. plinii*. Les diversités AFLP par région confirment ce patron, avec un gradient croissant de diversité du Nord vers le Sud en Italie, alors que ces diversités se révèlent équivalentes du Nord au Sud des Balkans. Ainsi, les périodes glaciaires ont drastiquement décimé au Nord de l'Italie les populations d'*A. plinii*, la recolonisation de cette région ne semble s'être réalisée que récemment avec des individus aneuploïdes. Bien que géographiquement proches d'*A. donaciformis*, les cannes de Pline Nord-Italiennes possèdent beaucoup moins d'affinités génétiques (AFLP) et cytogénétiques avec l'endémique ligure que les populations euploïdes du Sud. La différenciation spécifique d'*A. donaciformis* pourrait témoigner d'un isolement ancien après une colonisation postglaciaire, vers le Nord, antérieure à celle qui a installé les populations Nord-Italiennes actuelles. Les trois marqueurs génétiques montrent un fort isolement entre les péninsules italienne et balkanique opéré par la mer Adriatique, avec cependant l'identification génétique d'un passage quaternaire au niveau de Split (Centre Dalmatie).

Par rapport à *A. plinii*, la différenciation morphologique d'*A. donaciformis* repose principalement sur la présence de glumes supérieures longuement ciliées et des organes végétatifs et floraux de tailles supérieures (Hardion *et al.* 2012). Cette robustesse peut être attribuée à l'effet de gigantisme bien connu accompagnant régulièrement la polyploïdie

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis*

(Simonet 1932). Si la phylogéographie soutient la spéciation polyploïde d'*A. donaciformis* à partir de populations ancestrales d'*A. plinii*, elle indique aussi des phénomènes de polyploïdie équivalents au sein d'*A. plinii*, en limite d'aire de distribution du taxon sans différenciation morphologique particulière (Hardion *et al.* 2012). On note également que les valeurs morphométriques moyennes par station, issues de la révision systématique des *Arundo* méditerranéens, font apparaître certaines tendances lorsqu'elles sont comparées aux nouveaux résultats de la phylogéographie d'*A. plinii*. En effet, si les apparitions de hauts niveaux de ploïdie à $2n = 108-114$ semblent indépendantes, ces stations présentent presque toujours les individus les plus robustes au sein d'*A. plinii* (C8, D1, C6 et G8), à l'exception de la station de Malte (S14), sans atteindre toutefois les dimensions d'*A. donaciformis* (Figure 9).

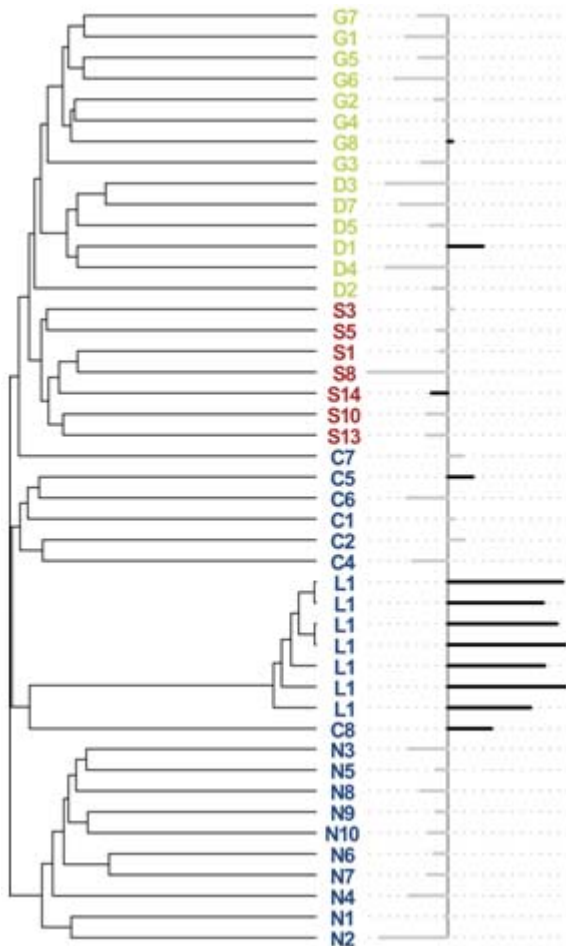


Figure 9. Relations phylogénétiques et différenciation morphologique entre les différents niveaux de ploïdie d'*A. donaciformis* (L1 : Ligurie) et d'*A. plinii* (G : Grèce ; D : Dalmatie ; S : Sicile ; C : Centre Italie ; N : Nord Italie). A gauche, phénogramme par neighbour-joining à partir des distances de Jaccard entre les génotypes AFLP; à droite, premier axe d'une ACP sur les données morphométriques (Cf. Hardion *et al.* 2012). Les couleurs reportent les clusters génétiques d'après la DAPC (voir article). Bleu, Italie ; rouge, Sicile ; vert, Balkans. Barres d'ACP grises, $2n=72-76$; barres d'ACP noires, $2n=108-114$. Analyses générées avec le logiciel R (R development core team 2013).

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis*

Les données phylogénétiques et caryologiques de ce chapitre ont été acquises dans une logique de taxonomie intégrative renforçant la simple révision des *Arundo* méditerranéens par des éléments de compréhension sur l'évolution du genre. Ces résultats révèlent la spéciation d'*A. donaciformis* à 18X par différenciation péripatrique récente (Quaternaire) à partir de certaines populations de son espèce-sœur, *A. plinii* s.s. à 12X. Cependant, ces données montrent aussi l'intégration de l'endémique Ligure au sein de la phylogénie d'*A. plinii*, qui devient une espèce paraphylétique d'après l'ADNcp. De plus, le rôle de la polyploïdie dans la spéciation d'*A. donaciformis* se trouve relativisé par l'existence de quelques hauts niveaux de ploïdie (18X) chez *A. plinii*. Ces deux constats sur l'histoire évolutive d'*A. donaciformis* pourraient ne pas soutenir son statut spécifique, si l'on prend en compte la notion d'espèce phylogénétique, ou même le barcoding ADN (Cf. introduction générale). Soulignons toutefois qu'en considérant les séquences et les méthodes classiquement utilisées en barcoding (matK, rbcL, trnT-trnL), nos résultats préliminaires réduiraient le genre *Arundo* à une seule espèce. Malgré la variabilité génétique exceptionnellement faible des *Arundo*, l'utilisation de différents marqueurs systématiques a permis de réaliser ce travail taxonomique, notamment par la sélection de critères morphologiques hautement fiables. Contrairement aux résultats phylogénétiques, les données de caryologie (races eu- ou aneuploïdes, niveaux 12 ou 18x) et de cytogénétique moléculaire (nombre de régions d'ADN ribosomal différents : 4 vs. 6 chez *A. plinii* à 18X : Cf Manuscrit H) confirment la différenciation spécifique d'*A. donaciformis*. Enfin, l'interprétation conjointe de ces données rend l'espèce plus légitime que sa simple description morphologique.

Annexes

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis*

33 m, 16 Oct 2010, *LH IL1/10-94* (MARS 00067) [Fig. 6A]; Italy, Liguria, Andorra, in the cliff between Via Julia Augusta and the sea, 43°57'49" N, 08°10'00" E, 68 m, 16 Oct 2010, *LH IL2/10-90* (MARS 00068); Italy, Liguria, near Finale Ligure, 44°10'39" N, 08°22'12" E, 68 m, 5 June 2011, *LH IL3/11-22* (MARS 00069); France, Puget-sur-Argens, urban wasteland, 43°26'38" N, 06°42'28" E, 20 Feb 2013, *LH 10-05* (MARS 00064).

Arundo donax L.

$2n = 108$, CHN; Iran, Golestan, Tamak, Nov 2012, *BZ DoIG/13-02* (MARS 03836); Iran, Gilan, Kiashahr, Nov 2012, *BZ DoIK/13-01* (MARS 03839).

$2n = 110$, CHN; Peru, Lima, Ventanilla callao, 26 Apr 2012, *BV 13-35* (MARS 03664);

$2n = 110$, CHN; $2n \sim 18x$, FCM, 2C DNA = 4.87 pg; Italy, Sardinia, San-Pietro Island, Carloforte, 18 Feb 2012, *AF 13-05* (MARS 05001).

$2n \sim 18x \sim 108$, FCM, 2C DNA = 4.83 pg; France, Bouches-du-Rhône, Marseille, Cap Croisette, 5 Apr 2012, *AF DoC* (MARS 03837); FCM, 2C DNA = 5.02 pg; France, Bouches-du-Rhône, Marseille, Luminy, 5 Apr 2012, *AF s.n.* (MARS 05002).

Arundo donax var. *versicolor* (Mill.) Stokes

* $2n = ca. 108$, CHN; $2n \sim 18x$, FCM, 2C DNA = 4.91 pg; France, PACA, La Seyne-sur-Mer, in a public green, 43°05'19" N, 05°53'14" E, 20 m, 11 Nov 2011, *LH DoV/11-150* (MARS 03807).

Arundo formosana Hack.

* $2n = 72$, CHN; $2n \sim 12x$, FCM, 2C DNA = 3.57 pg; Taiwan, *Lyonnet Fol/11-56* (MARS 00045). [Fig. 6B]

Arundo micrantha Lam.

$2n = 72$, CHN; Croatia, Split, in a waste ground, 43°31'42" N, 16°30'07" E, 41 m, 6 Jul 2012, *LH 12-14* (MARS 00136); France, Alpes-Maritimes, Golfe-Juan, between Via Julia Augusta and railway, 43°33'48" N, 07°04'08" E, 5 m, 5 Dec 2010, *LH FD2/10-147* (MARS 00075) [Fig. 6C]; France, Languedoc-Roussillon, Ste-Lucie Island, in a cliff between railway and nature reserve, 43°03'25" N, 03°01'51" E, 10 m, 8 Aug 2011, *LH FD4/11-155* (MARS 00076); Greece, Messolonghi, between road and olive field, in sympatry with *A. plinii* s.str., 38°22'42" N, 21°28'37" E, 19 m, 10 Apr 2011, *LH & BV GS1/11-47* (MARS 00081); Greece, Itea, in a waste ground, 38°26'14" N, 22°25'25" E, 6 m, 10 Apr 2011, *LH & BV GS3/11-48* (MARS 00082); Greece, Euboea Island, Vasiliko, on the Lilas riverside, 38°25'29" N, 23°39'31" E, 11 m, 11 Apr 2011, *LH & BV GE2/11-51* (MARS 00080); Greece, Crete, Mires, at the edge of orange fields, 35°04'05" N, 24°47'06" E, 24 m, 15 Apr 2011, *BV GC2/11-55* (MARS 00078); Greece, Crete, Mirtos, on the river bank, 35°00'21" N, 25°35'16" E, 10 m, 17 Apr 2011, *BV GC3/11-56* (MARS 00079); Italy, Trieste, seafront, 45°45'02" N, 13°39'16" E, 1 m, 28 Feb 2011, *LH IT1/11-19* (MARS 00083); Morocco, Tanger, between habitations, 35°44'44" N 05°53'07" W, 57 m, 3 Jul 2011, *LH MMI/11-141* (MARS 00086); Morocco, Rabat, roadside, 34°01'43" N, 06°47'42" W, 4 Jul 2011, *LH MM3/11-141* (MARS 00087); Spain, Amposta, at the edge of an olive field, 40°41'21" N, 00°34'31" E, 14 m, 19 Dec 2010, *LH EE1/10-151* (MARS 00090); Spain, Jaen, under a road-bridge on the Guadalquivir riverside, 38°01'32" N, 03°54'54" W, 212 m, 25 Nov 2010, *LH ES1/11-136* (MARS 00092); Spain, Cordoba, roadside, 37°56'42" N, 04°29'50" W, 135 m, 25 Nov 2010, *LH ES2/11-139* (MARS 00093); Spain, Bonares, at the edge of farming, 37°20'39" N, 06°40'37" W, 56 m, 26 Nov 2010, *LH ES5/10-142* (MARS 00096).

$2n = 72$, CHN; $2n \sim 12x$, FCM, 2C DNA = 3.23 pg; Italy, Sardinia, Las Plassas, 18 Feb 2013, *AF 13-06* (MARS 05000).

$2n \sim 12x \sim 72$, FCM, 2C DNA = 3.15 pg; Spain, near Algeciras, edge of agricultural fields, *AF MAl* (MARS 03840).

Laurent Hardion,¹ Régine Verlaque,¹ Alain Fridlender,² Bahram Zehzad³ & Bruno Vila^{1*}

¹ Aix-Marseille Université, CNRS, IMBE UMR 7263, 13331 Marseille, France

² Aix-Marseille Université, DENTES, 13331 Marseille, France

³ Ferdowsi University of Mashhad Herbarium (FUMH), Iran

* Author for correspondence: bruno.vila@imbe.fr

Materials gathered by A. Fridlender (AF), L. Hardion (LH), R. Verlaque (RV), B. Vila (BV) and B. Zehzad (BZ); counted by L. Hardion, R. Verlaque and B. Vila and analysed in FCM by A. Fridlender. *Petunia hybrida* (PxPC6, 2C = 2.85 pg) was used as internal standard to determine DNA content by FCM (Partec CyFlow 532 nm laser cytometer).

* First chromosome count for the species.

** New chromosome number (cytotype) for the taxon.

POACEAE

Arundo donaciformis (Loisel.) Hardion & al.

* $2n = 108$, CHN; Italy, Liguria, Cervo, between Via Julia Augusta and the railway, toward Andorra, 43°55'38" N, 08°07'37" E,

Arundo plinii Turra s.str.

$2n = 72$, CHN; $2n \sim 12x$, FCM, 2C DNA = 3.62 pg; Italy, Calabria, between Dinami and San Calogero, on ancient agricultural fields, 38°33'38"N, 16°04'54"E, 98 m, 3 Jun 2011, *LH IS3/11-124* (MARS 00128).

$2n = 72$, CHN; $2n \sim 12x$, FCM, 2C DNA = 3.42 pg; Greece, Peloponnesus, Patras, in the hills surrounding the town, on an abandoned parcel between farming, 38°14'26"N, 21°46'02"E, 178 m, 10 Apr 2011, *LH & BV GP3/11-45* (MARS 00105).

** $2n = 74$, CHN; $2n \sim 12x$, FCM, 2C DNA = 3.46 pg; Italy, Sicily, Agrigento, roadside at the entering of the town, 37°19'13"N, 13°35'10"E, 223 m, 4 Jun 2011, *LH IS6/11-131* (MARS 00131).

$2n = 76$, CHN; $2n \sim 12x$, FCM, 2C DNA = 3.25 pg; Italy, Campania, Napoli, near the Averno lake, roadside, 40°50'09"N, 14°03'52"E, 77 m, 3 Nov 2010, *LH & BV IC1/10-120* (MARS 00109).

$2n = 76$, CHN; $2n \sim 12x \sim 108$, FCM, 2C DNA = 3.29 pg; Italy, Campania, near Salerno, 6 Oct 2012, *AF s.n.* (MARS 03806).

$2n = 76$, CHN; $2n \sim 12x$, FCM, 2C DNA = 3.62 pg; Italy, Sicily, Castellamare del Golfo, in an abandoned field, 38°01'11"N, 12°53'55"E, 57 m, 4 Jun 2011, *LH IS8/11-132* (MARS 00133).

$2n = 76$, CHN; $2n \sim 12x \sim 76$, FCM, 2C DNA = 3.44 pg; Italy, Sicily, S. Madonie Mountains, between Petralia and Castellana, wide pasture, 830 m, 19 Oct 2011, *AF 11-160* (MARS 05011).

$2n = 108$, CHN; $2n \sim 18x$, FCM, 2C DNA = 4.82 pg; Italy, Sicily, roadside between Siracusa and Augusta, 37°18'31"N, 15°06'26"E, 71 m, 3 Jun 2011, *LH IS4/11-127* (MARS 00129).

$2n = 108$, CHN; $2n \sim 18x \sim 108$, FCM, 2C DNA = 4.60 pg; Greece, Crete, Sirili, 35°29'56"N, 23°48'54"E, 49 m, 13 Apr 2011, *BV GC4/11-57* (MARS 00100).

** $2n = 114$, CHN; $2n \sim 18x$, FCM, 2C DNA = 4.63 pg; Italy, Puglia, Rodi Gargano, coastline, on the side of the railway, 41°55'58"N, 15°55'16"E, 8 m, 4 Nov 2011, *LH & BV IC4/10-126* (MARS 00112).

** $2n = 114$, CHN; $2n \sim 18x \sim 108$, FCM, 2C DNA = 4.97 pg; Malta, Wadi between Ta'Brija and Ta'Zuta, 130 m, 21 Nov 2011, *AF 11-182* (MARS 05003).

For the five species currently placed in the genus *Arundo* L., chromosome data available exhibit only two ploidy levels: $12x$ and $18x$. The most common cytotype is $2n = 12x = 72$, shared by all *Arundo* species, except the Ligurian endemic *A. donaciformis* (S France and NW Italy) characterized by the euployploid level $2n = 18x = 108$. At the opposite, the circum-Mediterranean *A. micrantha* always shows the same low level $12x$. The cosmopolitan *A. donax* exhibits a clear geographic structuring: $2n = 12x = ca. 72$ in Asia (Thailand: Larsen, 1963; India: Christopher & Abraham, 1971; Mehra & Kalia, 1975; Uzbekistan: Bochantseva, 1972), and $2n = 18x = ca. 108$ for introduced plants in Mediterranean Basin (Gorenflot & al., 1972a; Hardion &

al., 2011, 2012) and America. The most common ploidy level for the Italo-Balkan endemic *A. plinii* s.str. remains $12x$, but news counts indicate $18x$ in some marginal populations from Crete, Italy and Sicily. In addition, our data also highlight strong aneuploidy phenomena concerning the two ploidy levels: $2n = ca. 72-74-76$ and $2n = 108-114$. However, measures in flow cytometry (FCM) differentiate only the two ploidy levels, but fail to detect aneuploidy.

Hakonechloa macra Makino

** $2n = 48$, CHN; Japan, accurate origin unknown, horticultural plant cultivated in the greenhouse of Aix-Marseille University, *LH Hal/11-207* (MARS 03811).

Molinia caerulea subsp. *arundinacea* (Schrank) K. Richt.

$2n = 36$, CHN; France, PACA, La Méridolle, between Vitrolles and Aix-en-Provence, watercourse, 43°29'12"N, 05°19'07"E, 127 m, 9 Oct 2011, *LH 11-181* (MARS 03808).

Long time considered as a Poaceae dustbin group (Prat, 1960), Arundinoideae Dum. currently remain the smaller (15 genera and ca. 44 species) and less resolved subfamily (GPWG, 2001). Formerly gathering 72 genera (Renvoize, 1981), this grass subfamily was drastically reduced with the distinction of Danthoioideae Barker & H.P. Linder subfamily (GPWG, 2001). Our new counts must be added to the data already known in this group for *Arundo* and *Phragmites* (see below), as well as *Molinia* Schrank ($2n = 36, 54, 72, 90, 108$; Dančák & al., 2012), *Hakonechloa* Makino ($2n = 48$ here and 50; Ono & Tateoka, 1953), *Dregeochloa* Conert ($2n = 42$; Du Plessis & Spies, 1988), *Monachather* Steud. ($2n = 72$; Brock & Brown, 1961, as *Danthonia bipartita* Muell.), *Styppeiochloa* Winter ($2n = 24, 48$; Roodt & al., 2002) and *Elytrophorus* Dum. ($2n = 24, 26$; Mehra & Kalia, 1975; Veyret, 1958). The literature suggests $x = 6, 9, 12$ as chromosomal base numbers for Arundinoideae (Conert, 1961; GPWG, 2001). The $2n = 18$ cytotypes reported for *Molinia caerulea* (Mattick-Ehrensberger, 1950; Milkovits & Borhidi, 1986) were recently rejected by a Dančák & al. (2012). As an euploid number, $2n = 24$ discards $x = 9$ whereas $2n = 42$ and 54 support $x = 6$.

Phragmites australis (Cav.) Trin. ex Steud.

$2n = 48$, CHN; France, Bouches-du-Rhône, Chateaneuf-les-Martigues, along the trail of Patafloux, Apr 2012, *RV 10-30* (MARS 03838).

$2n \sim 8x \sim 48$, FCM, 2C DNA = 2.04 pg; Spain, Baleares, Isla de Mallorca, Albuferra, wetland, 19 Apr 2012, *AF s.n.* (MARS 03544).

$2n = 72$, CHN; Peru, Ica desert, between the road and a cultivated field, 24 Apr 2012, *BV 13-36* (MARS 03663).

$2n = 96$, CHN; China, road side near Nankin, Nov 2012, *Huiyi Wu 12-51* (MARS 03671); France, Bouches-du-Rhône, reed back beach near Sausset-les-Pins, Nov 2012, *RV 13-55* (MARS 03670).

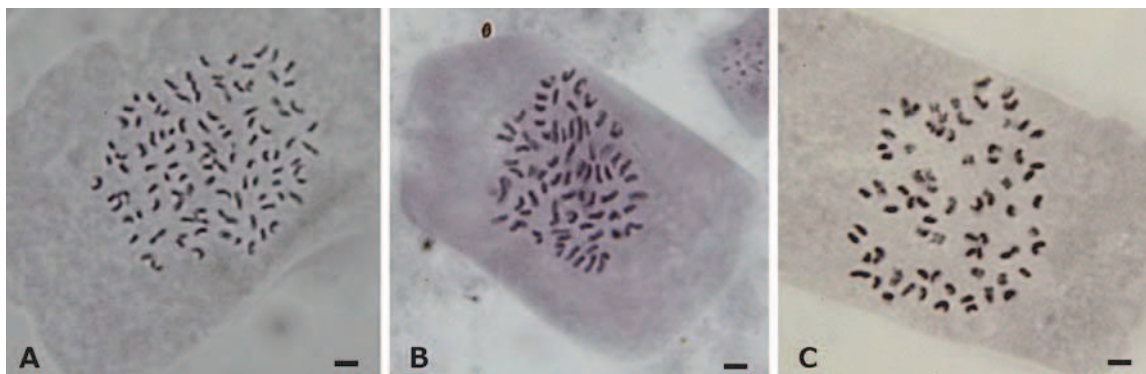


Fig. 6. Mitotic metaphases of **A**, *Arundo donaciformis* (Cervo, Italy), $2n = 108$; **B**, *A. formosana* (Taiwan), $2n = 72$; **C**, *A. micrantha* (Golfe Juan, France), $2n = 72$. — Scale bars = 2 μ m.

$2n \sim 16x$, FCM, 2C DNA = 4.00 pg; France, Bouches-du-Rhône, Camargue, wetland, 17 Apr 2012, *AF s.n.* (MARS 05004).

Phragmites frutescens H. Scholz

* $2n = 48$, CHN; Greece, Peloponnese, roadside toward Kavasilas, 37°52'34"N, 21°16'02"E, 13 m, 9 Apr 2011, *LH & BV Pfl/11-46* (MARS 03810); Greece, Crete, Georgiopolis, 35°21'16.5"N, 24°16'47.3"E, 1 m, back beach, in the sand, 14 Apr 2011, *BV Pfl/11-58* (MARS 03668); Lebanon, Tyr, 14 Jul 2011, *FM 11-302* (MARS 03809).

Phragmites karka (Retz.) Trin. ex Steud.

$2n = 50$, CHN; Cambodia, near Phnom Penh, along the river, Aug 2012, *David 12-52* (MARS 03841).

Phragmites mauritianus Kunth

$2n = 48$, CHN; Madagascar, Itasy region, Amparaky, sandy bank of the river, 18°56'08"S, 46°39'03"E, 980 m, 28 Feb 2011, *BV Pm/11-26* (MARS 03669).

In *Phragmites* Adans., all endemic taxa possess the same ploidy level $2n = 8x = 48$ (E Mediterranean *P. frutescens*, S African *P. mauritianus*, Asian *P. karka* and *P. japonica*). On the opposite, the cosmopolitan *P. australis* shows a strong chromosomal variability, with six ploidy levels and many aneuploids around the number 48 ($2n = \text{ca. } 36, 48, 72, 96, 120, 132$; Gorenflot & al., 1972b; Clevering & Lissner, 1999).

Literature cited

- Bochantseva, Z.P.** 1972. O chislakh chromosom. *Introd. Akklim. Rast. (Tashkent)* 3: 44–53.
- Brock, R.D. & Brown, J.A.M.** 1961. Cytotaxonomy of Australian *Danthonia*. *Austral. J. Bot.* 87: 289–295.
- Christopher, J. & Abraham, A.** 1971. Studies on the cytology and phylogeny of South Indian grasses: I. Subfamilies Bambusoideae, Oryzoideae, Arundinoideae and Festucoideae. *Cytologia* 36: 579–594. <http://dx.doi.org/10.1508/cytologia.36.579>
- Clevering, O.A. & Lissner, J.** 1999. Taxonomy, chromosome numbers, clonal diversity and population dynamics of *Phragmites australis*. *Aquatic Bot.* 64: 185–208. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3770\(99\)00059-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3770(99)00059-5)
- Conert, H.J.** 1961. *Die Systematik und Anatomie der Arundineae*. Weinheim: Verlag von J. Cramer.
- Dančák, M., Duchoslav, M. & Trávníček, B.** 2012. Taxonomy and cytogeography of the *Molinia caerulea* complex in central Europe. *Preslia* 84: 351–374.
- Du Plessis, H. & Spies, J.J.** 1988. Chromosome studies on African plants. 8. *Bothalia* 18: 119–122.
- Gorenflot, R., Cartier, D. & Raicu, P.** 1972a. Caryologie de la Canne de Provence. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Ser. D* 274: 391–393.
- Gorenflot, R., Raicu, P., Cartier, D., Ciobanu, I., Stoian, V. & Staicu, S.** 1972b. Le complexe polyploïde du *Phragmites communis* Trin. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Ser. D* 274: 1501–1504.
- GPWG (Grass Phylogeny Working Group)** 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 88: 373–457. <http://dx.doi.org/10.2307/3298585>
- Hardion, L., Verlaque, R., Fridlender, A. & Vila, B.** 2011. [Reports]. In: Marhold K. (ed.), IAPT/IOPB Chromosome data 11. *Taxon* 60: 1221.
- Hardion, L., Verlaque, R., Baumel, A., Juin, M. & Vila, B.** 2012. Revised systematics of Mediterranean *Arundo* (Poaceae) based on AFLP fingerprints and morphology. *Taxon* 61: 1217–1226
- Larsen, K.** 1963. Studies in the flora of Thailand. 14. Cytological studies in vascular plants of Thailand. *Dansk Bot. Ark.* 20: 211–275.
- Mattick-Ehrensberger, R.** 1950. [Report]. Pp. 44–45 in: Tischler, G. (ed.), *Die Chromosomenzahlen der Gefäßpflanzen Mitteleuropas*. Gravenhage: W. Junk. <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-5958-6>
- Mehra, P.N. & Kalia, V.** 1975. [Report]. Pp. 501–516 in: Löve, A. (ed.), IOPB chromosome number reports XLIX. *Taxon* 24: 511.

Milkovits, I. & Borhidi, A. 1986. Studies of *Molinia caerulea* complexes in Hungary. *Acta Univ. Upsal., Symb. Bot. Upsal.* 27: 139–145.

Ono, H. & Tateoka, T. 1953. Karyotaxonomy in Poaceae. I. Chromosomes and taxonomic relations in some Japanese grasses. *Bot. Mag. (Tokyo)* 66: 18–27.

Prat, H. 1960. Vers une classification naturelle des Graminées. *Bull. Soc. Bot. France* 107: 32–79.

Renvoize, S.A. 1981. The sub-family Arundinoideae and its position in relation to a general classification of the Gramineae. *Kew Bull.* 36: 85–102. <http://dx.doi.org/10.2307/4119008>

Roodt, R., Spies, J.J., Malan, A.F., Holder, F. & Van Wyk, S.M.C. 2002. Poaceae. Chromosome studies on African plants. 17. The subfamilies Arundinoideae and Danthonioideae. *Bothalia* 32: 233–240.

Veyret, Y. 1958. Observations caryologiques chez quelques Graminées tropicales. *J. Agric. Trop. Bot. Appl.* 5: 308–310.

MANUSCRIT E

Title Distinct patterns of persistence between peninsulas for the lowland *Arundo plinii* and Quaternary speciation of *A. donaciformis* (Poaceae)

Authors Laurent Hardion, Régine Verlaque, Alex Baumel and Bruno Vila

Address Aix Marseille University, CNRS, IMBE UMR 7263, 13331, Marseille, France

Corresponding author Laurent Hardion, Aix Marseille University, IMBE case 4, place Victor Hugo, 13331, Marseille, France, laurent.hardion@imbe.fr

Running head Phylogeography of *Arundo plinii*

ABSTRACT

Aim The lowland peninsular *Arundo plinii* was investigated (i) to understand the origin of the Ligurian endemic *A. donaciformis* ($2n = 108$) and its position in the evolution of *A. plinii* ($2n = 72$), (ii) to study the persistence patterns of a lowland peninsular species along two parallel latitudinal gradients, (iii) and to determine the biogeographic impact of the Adriatic sea on this plant model.

Location The central Mediterranean peninsulas: the Italian, from Liguria to Malta; and the Balkan, from Istria to Crete.

Methods Based on range-wide sampling, (i) 4590 bp of cpDNA from intergenic spacers were analysed in a Bayesian framework to date divergence times and infer phylogeographic scenarios; (ii) 852 AFLP markers were used to explore the genetic structure and diversity on a genome-wide scale; and (iii) variation of chromosome number was studied regarding its impact on genetic differentiation and speciation.

Results *Arundo plinii* shows a Late Tertiary divergence into two cpDNA lineages, then a Quaternary diversification of both lineages, including *A. donaciformis*. In addition to a clear peninsular differentiation, the three genetic markers revealed a strong south-north decrease of genetic diversity in Italy, vs. equivalent genetic diversities between the N and S Balkans. The genetic data are congruent with drawing closer affinities of *A. donaciformis* with central and southern Italian populations than with the geographically nearest samples from Northern Italy.

Main conclusions This study suggested different patterns of peninsular persistence between Italy vs. the Balkans: *A. plinii* persisted mainly in Sicily until the Pleistocene glaciations, vs. in the northern and southern Balkans. We also suggest the existence of secondary refugia in Liguria for the Late Quaternary isolation and differentiation of *A. donaciformis*, and a more recent recolonisation of *A. plinii* in central and northern Italy. Finally, this study highlighted the biogeographic role of the Adriatic Sea as a structural but permeable barrier for *A. plinii*.

Keywords phylogeography, speciation, polyploidy, refugia, Mediterranean peninsula, Adriatic Sea

INTRODUCTION

The Mediterranean peninsulas are recognized as major areas of biodiversity, representing both engines of speciation and reservoirs of genetic diversity (Comes, 2004; Hewitt, 2011). With these peninsulas containing 80% of European endemic plants, their species richness is often attributed to a legacy of climate and geological changes from the Tertiary, which has been associated with long-term persistence and habitat heterogeneity in the Mediterranean (Thompson, 2005; Feliner, 2011). Moreover, most European widespread taxa exhibit higher genetic diversity in their peninsular populations than at higher latitudes (Comes & Kadereit, 1998). This pattern, called ‘southern richness to northern purity’ (hereafter termed SR-NP; Hewitt, 2000) is recognised as a Pleistocene consequence of a *tabula rasa* due to stronger impacts of glacial periods to the north. This scenario involves repeated range contractions induced by glacial cycles, including founder effects due to northward interglacial expansion, and demographic stability of peninsular populations (Hewitt, 1996).

While this SR-NP pattern has been widely identified from European taxa (Petit *et al.*, 2002; Magri *et al.*, 2006), species rarely exhibit this structure on a peninsular scale (Weiss & Ferrand, 2006). Rather, several studies focusing on Iberia have revealed strong population divergences due to isolation and allopatric differentiation, a concept termed ‘refugia within refugia’ (hereafter referred to as RWR; review in Gomez & Lunt, 2007). These studies invoked the high habitat diversity of Mediterranean landscapes to explain both persistence and differentiation across the Pleistocene. A preponderant role is attributed to Mediterranean mountains, creating spatial barriers between populations and allowing altitudinal range-shifts towards milder environmental conditions. It is legitimate to question the persistence of lowland and coastal plant species within peninsulas, since they cannot take advantage of altitudinal descent to avoid climatic challenges (Surina *et al.*, 2011).

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

The genetic structuring of peninsular taxa has been comprehensively investigated in Iberia (Gomez & Lunt, 2007), but not much research has been carried out in Italy, and even less in the Balkans. The Italian Peninsula is characterized by its recent formation (i.e. Late Pliocene–Pleistocene). This history is consistent with (i) lower molecular divergence found between Italian lineages (mainly Pleistocene; as per the review by Hewitt, 2011) and (ii) occurrences of hotspots and refugia on the oldest geological units, in SW (i.e. Calabro-Peloritan block) and NW Italy (i.e. Ligurian Alps; Médail & Diadema, 2009). Although the Balkans exhibit the highest species richness among the three Mediterranean peninsulas, they remain the least extensively studied (Griffiths *et al.*, 2004). Here again, the complex Balkan topography is invoked to explain observed RwR patterns of persistence and differentiation (Bardy *et al.*, 2010). The parallel coastlines of these two peninsulas that delimit the Adriatic basin are unusually biodiverse, garnering 72% of European endemic species (Finnie *et al.*, 2007). Although Mediterranean biogeography was classically structured on the basis of each side of the Adriatic Sea, the floristic coherence of the Adriatic region has long been accepted (Takhtajan, 1986), and some inter-peninsular dispersal events are known (Bellusci *et al.* 2010; Kucera *et al.*, 2010). However, as already suggested for Gibraltar, these biogeographic elements could act as a filter effect, facilitating or preventing the dispersal of phylogenetic lineages according to their biological traits (Lavergne *et al.*, 2013).

Widespread along two peninsular gradients exceeding 1000 km of latitudinal range, *Arundo plinii* Turra *s.str.* (Poaceae) is a well-suited model for the investigation of phylogeographic patterns on both sides of the Adriatic Sea. Commonly distributed at low altitudes, this Italo-Balkan species mainly occurs in the (per)humid zones of the Mediterranean area. In addition to the Eurasian *A. donax* L. and the Taiwanese *A. formosana* Hack., the genus *Arundo* includes the circum-Mediterranean *A. micrantha* Lam. and the

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

Ligurian *A. donaciformis* (Loisel.) Hardion *et al.* (Hardion *et al.*, 2012). In the Mediterranean, *A. plinii* s.str. is the only *Arundo* species possessing genetic diversity and fructiferous ability. This biological trait is alarming for the restricted endemic *A. donaciformis*, a protected species that is highly endangered on the French Riviera. Moreover, previous studies have suggested a close genetic relationship but polyploid distinction between *A. donaciformis* ($2n = 108$) with *A. plinii* ($2n = 72-76$; Hardion *et al.*, 2011). Known to possess a competitive-ruderal life history (Danin, 2004; Quinn & Holt, 2008), *Arundo* species mainly occur in lowland and human-disturbed landscapes, at the edge of agricultural parcels and riverbanks, or spread over abandoned farmland. They form linear to radial patches of dense clusters of rhizomes, ensuring their local persistence by vegetative growth. However, *A. plinii* is also able to disperse over long distances through its wind-dispersed lemma.

Here, we used *A. plinii* and its sister species *A. donaciformis* to investigate a case of diversification of Mediterranean peninsular lowland taxa. Our specific aims were (i) to better understand the origin of the Ligurian endemic *A. donaciformis* and its position in the evolutionary history of *A. plinii*, (ii) to compare the migration and persistence patterns of *A. plinii* between peninsulas, (iii) and to determine the influence of the Adriatic region on this plant model. To achieve these objectives, we documented three molecular and genetic datasets. Firstly, cpDNA sequence polymorphism was analysed in a Bayesian framework to date divergence times and infer phylogeographic scenarios, i.e. to reconstruct refugia areas and migration patterns. Secondly, amplified fragment length polymorphism (AFLP) was explored genome-wide to investigate genetic structure and diversity of *A. plinii* lineages. Finally, chromosome number variations were studied with regard to the evolution of aneuploidy and polyploidy from genetic differentiation to speciation.

MATERIALS AND METHODS

Plant sampling and DNA extraction

Proportionally to their distribution range, 51 populations of *A. plinii* and eight of *A. donaciformis* were sampled and gathered in voucher specimens deposited in the Herbarium of Aix-Marseille University (MARS; Appendix S2 & S3, supporting information). *Arundo* populations generally form continuous and monospecific patches *in situ*, making genets difficult to detect. In order to avoid over-sampling of the same clone, we first analysed two samples from each population that were more than 50 m apart. Approximately 50 mg of silica-dried leaves from greenhouse-cultivated samples were crushed with liquid nitrogen. Total DNA was extracted following Cetyl-trimethyl-ammonium bromide protocol (Doyle & Doyle, 1987) with the following modifications: 1.4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8), and 4% Hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide. After precipitation with 95% ethanol, the centrifuged pellets were washed in 70% ethanol, dried, and suspended in TE-buffer with RNase. DNA concentrations were measured using a Biophotometer™ (Eppendorf, Germany) and diluted to 50 ng/μL.

PCR amplification and sequencing

Due to the low evolutionary rate of the genus *Arundo* (Hardion *et al.*, 2012), extensive screening of sequence variation was performed on nine cpDNA loci: trnL-trnF, trnT-trnL (Taberlet *et al.*, 1991), matK, trnK-matK (Johnson & Soltis, 1994), rps4-trnT2, trnCF-rpoB, psaA-ORF170, rbcL-psaI, and trnS(GCU)-psbD (Saltonstall, 2001). From this, we selected the five loci exhibiting clear nucleotide variability, i.e. trnCF-rpoB, psaA-ORF170, rbcL-psaI, trnS(GCU)-psbD, and trnT-trnL. Polymerase chain reactions (PCR) were performed containing 2.5 mg DNA, 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.001% w/v gelatin),

1.5 mM MgCl₂, 2.5 mM of each dNTP, 40 pmol of each primer, 0.1 µg/µL bovine serum albumin (BSA), and 2.5 units of *Taq* polymerase (Q-Biogen, Illkirch, France), in a total volume of 50 µL. The thermal cycling profile was programmed on a PTC-200 Gradient Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) as follows: 2 min at 94°C followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 56°C annealing for 1 min, and 72°C for 2 min, followed by a final extension of 72°C for 5 min. Purification and sequencing of PCR products were carried out by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

Phylogenetic inferences and divergence times

A total of 51 samples of *A. plinii* and eight of *A. donaciformis* were collected for the ingroup (Appendix S1). The outgroup included other previously studied *Arundo* species (Hardion *et al.*, 2012), i.e. *A. micrantha*, *A. donax*, and *A. formosana*, and three other genera—the cosmopolitan reed *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (MARS), and two Australian small grasses—identified as the closest genera to *Arundo* (Barker *et al.*, 1995; Barker, 1997), *Monachather paradoxus* (R.Br.) Steud. (CANB), and *Amphipogon turbinatus* R.Br. (P). All cpDNA data were deposited in GenBank (Appendix S2). Sequences were manually aligned using MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) and collapsed into a haplotype dataset.

In order to provide a temporal framework for phylogeographic inferences within *A. plinii*, node ages were estimated using BEAST 1.7.4 (Drummond *et al.*, 2012) under a relaxed clock method that assumes a log-normal distribution of rates. Molecular dating is usually calibrated on independent palaeobotanical data, but the records are not usable due to the uniformity of their pollen and their vegetative parts. Consequently, we used dating estimations of divergences between grass sub-families calculated from a large dataset (Christin *et al.*, 2008; pers. comm.). The crown node of the Arundinoideae, represented by the

divergence between the *Phragmites* and *Arundo* genera, was calibrated to 29.0 Ma (19.6–38.3), following a normal prior distribution. Best-fit substitution models were selected based on the Bayesian information criterion (BIC), independently for each sequence in JMODELTEST 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012). The tree prior followed the Yule process speciation model to estimate species divergence. Five independent Markov chain Monte Carlo searches were run with 5×10^7 generations, sampling every 500 and then discarding 1000 trees for burn-in. Stationarity and convergence of chains were monitored using TRACER 1.5. The trees were combined with LOGCOMBINER 1.7.4, and a maximum clade credibility (MCC) tree was summarised in TREEANNOTATOR 17.4 (Drummond *et al.*, 2006).

Phylogeographic reconstructions

Two complementary representations were chosen to show phylogeographic relationships between the cpDNA lineages. Firstly, genealogical relationships were estimated with a statistical parsimony network algorithm using TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), after manually encoding insertions and deletions (indels) and considering gaps as a fifth state. Secondly, phylogeographic analyses of the cpDNA dataset were conducted in BEAST. Indels were added as a secondary dataset in binary format by using a stochastic Dollo model as suggested by Alekseyenko *et al.* (2008). Evolutionary rates were estimated according to the previous analysis, modelled under a strict clock framework (clock and site model linked). A coalescent model with constant sizes of populations was used as tree prior. A Bayesian framework was used to assess ancestral distributions of each node along a time-calibrated phylogeny following Lemey *et al.* (2009). Implemented in BEAST, this method considers geographical diffusion as a discrete model in which character states change as a function of time. A K-means algorithm on geographic distances (kmean-function in STATS package in R 2.14.1; R

Core Team, 2011) was used to group localities into six biogeographical areas, according to effective and biogeographical constraints, avoiding $n < 3$ and the trans-Adriatic groups: Liguria (L), North Italy (N), Central Italy (C), Sicily (S, including Calabria and Malta), Dalmatia (D), and Greece (G, including Crete). For k -delimited areas, $k(k-1)/2$ reversible rates of diffusion between areas can be estimated using continuous-time Markov chains. To avoid over-parameterisation, Bayesian stochastic search variable selection (BSSVS) reduces the rate number by assuming that many infinitesimal rates are zero. Thus, a Bayes factor test delimits a number of significantly non-zero rates following a truncated Poisson prior distribution with a mean of $\ln 2$. This method considers branch lengths and tree uncertainties to assess posterior support of state transitions. Because geographical data could influence tree topologies for slightly divergent nodes, the topology was fixed in BEAST analyses according to the phylogeographic MCC tree previously generated without the BSSVS analysis (Lemey, pers. comm.). Ancestral area reconstructions were given only for nodes strongly supported by posterior probabilities (>0.95), discarding all ancestral areas with a probability inferior to 10%.

AFLPs

A total of 118 samples from 59 populations (two samples from 51 populations of *A. plinii* and eight of *A. donaciformis*) were genotyped using the AFLP procedure of Vos *et al.* (1995) with slight modifications (Hardion *et al.*, 2012). Six primer combinations were chosen for the selective PCR: *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAA, *EcoRI*-AGC/*MseI*-CTG, *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAC, *EcoRI*-ATG/*MseI*-CTA, *EcoRI*-ATC/*MseI*-CTC, and *EcoRI*-AGG/*MseI*-CGG, fluorescently labelled with 6-FAM at the 5' ends (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). AFLP fingerprints were generated from electrophoretogram alignments using GENEMAPPER 4.1

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Putative loci were defined as any fragment from 50 to 500 bp with a minimum amplitude of 200 relative fluorescent units. All overlapping peaks were discarded, and resulting fragments scored by their absence (0) or presence (1). Multi-locus genotypes were reduced to multi-locus lineages (MLLs) with the clones-function from the AFLPDAT script implemented in R 2.14.1 (Ehrich 2006; R Core Team, 2011) to reduce background signals due to somatic mutations or genotyping errors (de Witte *et al.*, 2011). The largest pairwise genetic difference among ten replicated pairs was defined as a consistent MLL threshold.

Because natural populations often violate the assumptions of Hardy-Weinberg equilibrium as required by many clustering methods, we chose a non-model-based approach to infer genetic clusters. The model-free discriminant analysis of principal components (DAPC) implemented in the ADEGENET R-package (Jombart *et al.*, 2010) uses the principal components of a preliminary multivariate analysis based on AFLP data to perform a discriminant analysis of genetic variation. This method tries different numbers of clusters (K) based on a K-means algorithm on principal components and uses BIC to assess the best clustering model.

Descriptive statistics were calculated for each biogeographical region and DAPC genetic cluster by using AFLPDAT: the number of fragments (F), number of private fragments (PF), percentage of polymorphic fragments (%P), and Shannon index (*I*). Two complementary approaches investigated the genetic relationships between samples. AFLPs were firstly explored using a principal coordinate (PCo) analysis, allowing a visualisation of the global structuring among MLLs. Principal coordinates were generated using Jaccard distances in R. Secondly, SPLITSTREE 4.12 (Huson, 1998) generated a NeighborNet diagram, i.e. a distance-based phylogenetic network using Nei and Li's genetic distances. Finally,

median genetic distance (Dice) between the three nearest neighbours was calculated for each sample and represented as a function of latitude to visualize the peninsular distribution of genetic divergence.

Chromosome counts

After a cold treatment of 4°C for one day, root tips from cultivated rhizomes were fixed in a solution of absolute alcohol:glacial acetic acid (4:1, v/v), kept at room temperature for two weeks, and then stored at -20°C. Root tips were then stained in 45% Aceto-carmin-ferriacetate, boiled for 3 min, and then squashed between a slide and cover-slide. Two samples per locality were studied and, for each one, the three best mitotic metaphases were identified by light microscopy (15 × 100, LM, Leitz Dialux 20, Munich, Germany), and chromosomes were counted on photographs (Canon EOS 550D) or drawn using a camera lucida.

RESULTS

Times of diversification

Estimations of divergence dates between lineages were performed on a 4590-bp-long alignment with 249 nucleotide substitutions (Table 1). The posterior evolutionary rate for cpDNA sequences was estimated as 6.02×10^{-10} substitutions per site per year. Within the monophyletic genus *Arundo* (Fig.1), the chronogram firstly showed the differentiation of *A. donax* and *A. formosana*, and then a monophyletic Mediterranean clade, including *A. micrantha*, *A. plinii*, and *A. donaciformis*. The differentiation of Mediterranean *Arundo* was estimated as 4.3 (0.92–10.9) Ma (Early Pliocene), beginning with the divergence of *A. micrantha* from the ingroup. Then, *A. plinii* differentiated at 3.6 (0.64–9.1) Ma (Mid-

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

Pliocene) in two main lineages (A and B), starting their diversification at 2.1 (0.20–5.7) and 2.0 (0.23–5.8) Ma (Early Pleistocene), respectively. Surprisingly, *A. donaciformis* was included within lineage B and did not possess a specific haplotype. Consequently, we grouped *A. donaciformis* with *A. plinii* in our phylogeographic analyses.

Phylogeographic reconstructions

The 4411bp cpDNA dataset, including six substitutions and nine indels, showed 11 different haplotypes for *A. plinii* and *A. donaciformis*. The statistical parsimony network clearly distinguished lineages A and B (warm vs. cold colours; Figs 1 & 2b), which were separated by at least three mutation steps and the outgroup insertion. The five haplotypes of lineage A were structured mainly around haplotype A3. Conversely, lineage B possessed a more complex history, with three missing haplotypes and one loop. The B haplotypes are gathered on a missing haplotype through a bi- or trifurcation towards B5, B6, and B1, followed by three or four derivations originating from B3. The only alternative connection was related to B1, linked to B3 through two mutation steps, or to the basal haplotype (absent from the data) through two steps.

The two main cpDNA lineages of *A. plinii* described above occurred in almost all regions (Fig. 2a). The cpDNA diversity was at a maximum in Sicily (n = 14) with seven haplotypes of which four were private (A1, A5, B4, and B5). This diversity drastically decreased northwards with only three haplotypes in Central Italy (A2, A3, B1; n = 9) and only one in North Italy (A2; n = 10) and Liguria (B1; n = 7). Regarding the parsimony network, Sicily exhibited haplotypes connected in the centre of the network (A3, B3), whereas the remaining Italian cluster possessed more external ones (A2, B1). The Balkan Peninsula

showed five haplotypes, three in each region, including one private (B2 in Greece, B6 in Dalmatia).

The MCC tree of cpDNA sequences from *A. plinii* and *A. donaciformis* (Fig. 2c) was broadly congruent with the statistical parsimony network, including some poorly supported nodes which corresponded to alternative connections or radial derivations in the network (Fig. 2b). For the four robustly supported nodes, discrete phylogeographic reconstructions designated the same ancestral areas, i.e. Sicily, Dalmatia, and Greece, despite their differential position in the tree (Table 2). For almost all supported nodes, Sicily possesses the highest posterior probabilities of being the ancestral area (node 1: 29%; 4: 55%; 5: 25%; 7: 68%).

AFLPs diversity

The six AFLP primer pairs allowed the scoring of 852 unambiguous fragments, of which 274 (31.7%) were polymorphic. The threshold delimiting multilocus lineages (MLLs), i.e. the maximum distance between pairwise controls, was assessed as 11 mismatches that correspond to an error rate of 2.0% (Appendix S3, supporting information). Forty-seven MLLs were derived from the 114 AFLP genotypes by using the clones function, with each locality exhibiting only one MLL. On a regional scale, Istria (n = 2; D1), Gargano (n = 2; C5), Crete (n = 2; G8), and Liguria (i.e. *A. donaciformis*, n = 8; L1) also exhibited only 1 MLL each.

The optimum number of genetic clusters found by the DAPC was $K = 3$, structuring an Italian (Liguria, N & C Italy), a Sicilian (including Calabria and Malta), and a Balkan cluster (Fig. 3). Among the three DAPC clusters (Table 3), Sicily possessed the highest Shannon index value of AFLP markers ($I = 0.159$), followed by the Balkans (0.150) and Italy (0.140). For biogeographical regions in the Italian peninsula, Shannon index values strongly decreased from Sicily ($I = 0.159$; SF = 38) to Liguria (0; <0.01). In contrast, these values were more

similar but constant throughout the Balkans, between Dalmatia (0.127) and Greece (0.125). These two contrasting patterns are clearly illustrated by the representation of average genetic distances from nearest neighbours as a function of latitude (Fig. 4).

The PCo representation and the NeighborNet diagram both supported DAPC clustering with their tri-directional shape. The PCo first axis clearly differentiated the Balkan samples from the Italian, except for Split (D2, Fig. 3a). The second principal coordinate distinguished the latitudinal regions of Italy, from Sicily and Calabria (S4 and S5) to C and N Italy. The NeighborNet (Fig. 3b) showed the same general pattern, but also divided the Balkan cluster into two geographical sub-groups: the Dalmatian and Greek regions. Despite its DAPC inclusion in the Balkan cluster, D2 possesses an intermediary position between the three genetic clusters (Fig. 3a) and clear genetic affinities with the Sicilian branch (Fig. 3b), as suggested above by the cpDNA haplotypes. The Ligurian MLL (i.e. *A. donaciformis*, $n = 8$; L1) showed an intermediary position between C Italy and Sicily on the two analyses, far from the N Italian samples which were strongly isolated.

Chromosome numbers

Our new counts distinguished five cytotypes ($2n = 72, 74, 76, 108,$ and 114 chromosomes) for *A. plinii* and $2n = 108$ for *A. donaciformis* (Fig. 5). According to the literature (Conert, 1961; GPWG 2001), three hypothetical chromosome base numbers have been proposed for the high polyploid subfamily Arundinoideae: $X = 6, 9,$ and 12 . Whatever the base number chosen, the multiple $2n = 72$ and 108 can be designated as a euploid series, and the others as derived aneuploid cytotypes. The distribution of cytotypes showed a clear geographical structuring (Fig. 5): C and N Italian samples exhibited only hyper-aneuploids ($2n = 76$ and 114), while the Balkan cluster exhibited only euploid numbers ($2n = 72$ and 108), as for the Ligurian *A.*

donaciformis ($2n = 108$). Conversely, Sicily possessed the strongest cytotype diversity, exhibiting all five chromosome numbers. In addition to *A. donaciformis*, a total of seven high polyploid MLLs have been geographically distinguished for *A. plinii*.

DISCUSSION

Divergence timing and polyploidy events

The diversification of *Arundo* lineages in the Mediterranean dates from the Early Pliocene. The split between the two main cpDNA lineages of *A. plinii* (~3.6 Ma) dates close to the onset of the Mediterranean climate (i.e. starting from 3.5 Ma, Late Pliocene). These two lineages occurred equally in each peninsula, and they showed simultaneous dating of basal diversification (2.0 and 2.1 Ma; Fig. 1). The timing of their diversification fits with the beginning of the Quaternary (2.58 Ma; Gibbard *et al.*, 2010), indicating that these lineages have persisted since at least the first glacial period.

Associated with this extant molecular variation that originated a million years ago, an unexpected variation in chromosome number was also discovered. The more ancestral cytotypes remain $2n = 72$, from which were derived aneuploid ($2n = 74-76$) and high polyploid ($2n = 108$) numbers. In addition to the cytotype of *A. donaciformis*, this study identified seven genetically distinct localities with high polyploids ($2n = 108-114$; Fig. 5). These high cytotypes probably resulted from the fusion of reduced and unreduced gametes from $2n = 72-76$ ancestral progenitors (Parisod *et al.*, 2010). The rate of unreduced gametes is known to increase with thermal shocks (Pécix *et al.*, 2012). As in many other complexes, it is noteworthy that we found *A. plinii* polyploids mainly on the N and S margins of each peninsula. Moreover, these high cytotypes often shared the same MLL at a regional scale

(dashed lines; Fig. 5), illustrating correlations among clonality, polyploidy, and marginal positions (Kawecki, 2008).

Origin of *A. donaciformis*

According to the cpDNA chronogram, the origin of *A. donaciformis* was included in the phylogeny of *A. plinii* (Fig. 1). Based on the AFLP data, the lack of genetic diversity and the absence of a private fragment for this taxon support a recent speciation from *A. plinii* in Liguria (Tab. 3). *A. donaciformis* exhibited a distinct MLL sharing more markers with MLLs found in C and S Italy than with the geographically closest populations from N Italy. Its eupolyploid cytotype ($2n = 108$) cannot derive from aneuploids ($2n = 76$) currently occurring in C and N Italy (Fig. 5), but rather from an ancestral lineage with $2n = 72$ as in S Italy (Calabro-Peloritan block). These results designate the Ligurian coast as secondary refugia after northward migration from primary southern refugia, as already suggested for white oaks (Petit *et al.*, 2002) and other taxa (Médail & Diadema, 2009). Moreover, *A. donaciformis* has persisted as a clonal polyploid and non-fructiferous form that is more robust than *A. plinii*. Indeed, high polyploids from *A. plinii* do not exhibit such a clear morphological differentiation as *A. donaciformis* (Hardion *et al.*, 2012). Thus, this study showed the ability of polyploids and clones to persist at range margins, under adverse conditions and through climate changes (Kawecki, 2008; Parisod *et al.*, 2010).

Italian SR-NP vs. Balkan RWR

In Italy, the contrast between haplotype richness ($n = 7$) in the South vs. homogeneity in the Centre ($n = 3$), the North, and in Liguria (both $n = 1$), clearly indicates an intra-peninsular SR-NP tendency. This peninsular gradient of diversity and the designation of Sicily as the only

ancestral area in Italy suggest a recent colonisation of *A. plinii* in northern areas vs. southern refugia (Hewitt, 2000). This pattern was also supported by the northward decrease of AFLP variation and pairwise genotypic distance (Table 3; Fig. 4a). Founder effects involved in post-glacial recolonisations were illustrated by the external position of N Italian samples from C Italian nodes in the NeighborNet (Fig. 3b). Cytotype distribution also confirmed this pattern, with five eu-aneuploid numbers in Sicily vs. two aneuploid cytotypes in N and C Italy. The ancestral cytotype ($2n = 72$) only occurs in E Sicily and Calabria, i.e. an old geological unit known for their biota conservation (Médail & Diadema, 2009). This *A. plinii* Italian SR-NP pattern contrasts with Batrachian phylogeographies, suggesting refugia at different latitudes in Italy, followed by post-glacial contacts and admixture (Canestrelli & Nascetti, 2008). These studies invoked altitudinal range shifts of these mountainous species to persist at different latitudes under climatic pejouration—a less likely scenario for the lowland *A. plinii*. Nevertheless, the few Italian phylogeographies found a southward increase of haplotype diversity for the mountain beech (*Fagus sylvatica* L.; Vettori *et al.*, 2004), and even major southern Italian-Sicilian refugia for the more thermophilous white and holm oaks (Fineschi *et al.*, 2002, 2005), but not for the (sub)alpine *Saxifraga callosa* L. and *Arabis alpina* L. (Grassi *et al.*, 2009; Ansell *et al.*, 2008). Consequently, further comparative studies are still needed to better understand the evolutionary processes involved in species persistence and migration between peninsulas (Comes, 2004; Feliner, 2011).

The SR-NP pattern found for *A. plinii* in Italy strongly differed from the latitudinal differentiation of populations in the Balkans. According to cpDNA data, both the Dalmatian and Greek regions corresponded to ancestral areas (Table 2). In addition, they possessed equivalent haplotype and AFLP diversities, relatively high numbers of private fragments (PF = 11 & 17; Table 3), and constant genetic divergences with latitudinal rise (Fig. 4). Moreover,

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

these two Balkan regions were clearly distinguished on the NeighborNet (Fig. 3b). A N-S phylogeographic polarity was already found for the *Veronica chamaedrys* group, due to a glacial isolation formed by the N Greek Mountains (Bardy *et al.*, 2010). Some paleoecological and phylogeographic studies have also highlighted refugia in both the S and NW Balkans for European-wide taxa (e.g. *Fagus*; Magri *et al.*, 2006). This ancestral occurrence of *A. plinii* in both parts of the Balkans vs. a recent spread in C and N Italy can be explained by the topographic complexity of the Balkan Peninsula, with numerous mountain ranges, valleys, and islands creating a wide habitat variety for species persistence (Surina *et al.*, 2011). However, the extent of the range of genetic diversity in the Balkans was equivalent to C Italy, and clearly lower than that in Sicily, which represents both the main ancestral area and the genetic hotspot for *A. plinii* (Table 3).

The Adriatic Sea: A biogeographical barrier despite trans-Adriatic contacts

Few studies have investigated the biogeographical role of the Adriatic Sea. Phylogeographic literature has often divided the Mediterranean Basin from the western and eastern sides of the Adriatic Sea, invoking a geological and climatic legacy from the Tertiary (Lumaret *et al.*, 2002; Besnard *et al.*, 2007; Migliore *et al.*, 2012). For *A. plinii*, the Adriatic Sea also appears as a structuring biogeographical element. Indeed, both genetic markers exhibit a predominant peninsular differentiation during the Pleistocene: (i) the occurrence of only three interpeninsular cpDNA haplotypes (A3, A4, and B3; Fig. 2), (ii) the prevalent AFLP differentiation on the first PCo axis (Fig. 3), and (iii) the absence of aneuploid numbers in the Balkans (Fig. 5).

Nevertheless, genetic similarities between Italy and the Balkans have been evidenced for several European plants, e.g. *Quercus* (Petit *et al.*, 2002), *Fagus* (Magri *et al.*, 2006), and

Laurus (Rodriguez-Sanchez *et al.*, 2009). For peninsular endemic taxa, dispersal events have been highlighted (Bellusci *et al.*, 2010), suggesting the existence of a land-bridge through the Strait of Otranto during the Messinian crisis (7-5.3 Ma; Clauzon *et al.*, 2005). However, this Tertiary connection does not match with the Quaternary differentiation of *A. plinii*. A more recent trans-Adriatic bridge between Italy and Croatia has also been assumed in some plant phylogeographies (Fineschi *et al.*, 2002; Kucera *et al.*, 2010). This hypothesis is supported by the regression of the Adriatic Sea level during glacial periods of the Pleistocene, and the emergence of a corridor of clayey shallow environments suitable for inter-peninsular dispersal (Dercourt, 2000). This sea-level regression is largely supported by recent stratigraphic studies designating the Po drainage area and barrier-lagoon system in the northern half of the Adriatic Sea (Maselli *et al.*, 2011). For *A. plinii*, the admixed MLL of Split (Croatia; D2; Fig. 3a) also supports a Late Quaternary contact between previously differentiated populations from C Italy and Dalmatia (Fig. 5). Thus, we suggest that the Adriatic Sea formed a structural but permeable barrier for *A. plinii* during the Pleistocene.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to all collectors who have contributed to greatly improving the plant sampling. LH would like to thank P.A. Christin and P. Lemey for their help in molecular dating and Bayesian inferences. The authors also acknowledge the help of A. Roig and B. Fady (URFM UR629 INRA) in the AFLP procedure and M. Juin and N. Duong (IMBE) for their participation in molecular experiments. This work is included in an Interdisciplinary Program of Research Urban-Environment (PIRVE) financed by the CNRS, the Ministry of Ecology (France) and the DREAL PACA. The authors are also grateful for other financial support provided by the Research Federation ECCOREV and the Botanical Society of France.

REFERENCES

- Alekseyenko, A.V., Lee, C.J. & Suchard, M.A. (2008) Wagner and Dollo: a stochastic duet by composing two Parsimonious solos. *Systematic Biology*, **57**, 772–784.
- Ansell, S.W., Grundmann, M., Russell, S.J., Schneider, H. & Vogel, J.C. (2008) Genetic discontinuity, breeding-system change and population history of *Arabis alpina* in the Italian Peninsula and adjacent Alps. *Molecular Ecology*, **17**, 2245–2257.
- Bardy, K.E., Albach, D.C., Schneeweiss, G.M., Fischer, M.A. & Schönswetter, P. (2010) Disentangling phylogeography, polyploid evolution and taxonomy of a woodland herb (*Veronica chamaedrys* group, Plantaginaceae *s.l.*) in southeastern Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **57**, 771–786.
- Barker, N.P. (1997) The relationships of *Amphipogon*, *Elytrophorus* and *Cyperochloa* (Poaceae) as suggested by rbcL sequence data. *Telopea*, **7**, 205–213.
- Barker, N.P., Linder, H.P. & Harley, E.H. (1995) Polyphyly of Arundinoideae (Poaceae): evidence from rbcL sequence data. *Systematic Botany*, **20**, 423.
- Bellusci, F., Musacchio, A., Palermo, A.M. & Pellegrino, G. (2010) Exploring the history of *Serapias politisii* (Orchidaceae), a narrow endemic on the opposite coasts of the Otranto channel: insights from molecular investigations. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **162**, 572–580.
- Besnard, G., Rubio de Casas, R. & Vargas, P. (2007) Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*). *Journal of Biogeography*, **34**, 736–752.
- Canestrelli, D. & Nascetti, G. (2008) Phylogeography of the pool frog *Rana* (*Pelophylax*) *lessonae* in the Italian peninsula and Sicily: multiple refugia, glacial expansions and nuclear–mitochondrial discordance. *Journal of Biogeography*, **35**, 1923–1936.

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

- Christin, P.A., Besnard, G., Samaritani, E. Duvall, M.R., Hodkinson, T.R., Savolainen, V. & Salamin, N. (2008) Oligocene CO₂ decline promoted C₄ photosynthesis in grasses. *Current Biology*, **18**, 37–43.
- Clauzon, G., Suc, J.P., Popescu, S.M., Marunteanu, M., Rubino, J.L., Marinescu, F. & Melinte, M.C. (2005) Influence of Mediterranean sea-level changes on the Dacic Basin (Eastern Paratethys) during the late Neogene: the Mediterranean Lago Mare facies deciphered. *Basin Research*, **17**, 437–462.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657–1659.
- Comes, H.P. (2004) The Mediterranean region – a hotspot for plant biogeographic research. *New Phytologist*, **164**, 11–14.
- Comes, H.P. & Kadereit, J.W. (1998) The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science*, **3**, 432–438.
- Conert, H.J. (1961) Die systematik und anatomie der Arundinae. J. Cramer, Weinheim.
- Danin, A. (2004) *Arundo* (Gramineae) in the Mediterranean reconsidered. *Willdenowia*, **34**, 361–369.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**, 772–772.
- Dercourt, J. (2000) Peri-Tethys palaeogeographical maps. Atlas Gauthier-Villars, Paris.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, **19**, 11–15.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A. (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, **4**, e88.

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

- Ehrich, D. (2006) AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 603–604.
- Feliner, G.N. (2011) Southern European glacial refugia: A tale of tales. *Taxon*, **60**, 365–372.
- Fineschi, S., Cozzolino, S., Migliaccio, M., Musacchio, A., Innocenti, M. & Vendramin, G.G. (2005) Sicily represents the Italian reservoir of chloroplast DNA diversity of *Quercus ilex* L. (Fagaceae). *Annals of Forest Science*, **62**, 79–84.
- Fineschi, S., Turchini, D., Grossoni, P., Petit, R.J. & Vendramin, G.G. (2002) Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy. *Forest Ecology and Management*, **156**, 103–114.
- Finnie, T.J.R., Preston, C.D., Hill, M.O., Uotila, P. & Crawley, M.J. (2007) Floristic elements in European vascular plants: an analysis based on *Atlas Florae Europaeae*. *Journal of Biogeography*, **34**, 1848–1872.
- Gibbard, P.L., Head, M.J. & Walker, M.J.C. (2010) Formal ratification of the Quaternary System/Period and the Pleistocene Series/Epoch with a base at 2.58 Ma. *Journal of Quaternary Science*, **25**, 96–102.
- Gómez, A. & Lunt, D.H. (2007) Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: *Phylogeography of Southern European Refugia* (eds Weiss, S. & Ferrand, N.), pp. 155–188. Springer, Amsterdam.
- GPWG -- Grass Phylogeny Working Group (2001) Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **88**, 373–457.
- Grassi, F., Minuto, L., Casazza, G., Labra, M. & Sala, F. (2009) Haplotype richness in refugial areas: phylogeographical structure of *Saxifraga callosa*. *Journal of Plant Research*, **122**, 377–387.
- Griffiths, H.I., Kryštufek, B. & Reed, J.M. (2004) *Balkan biodiversity: pattern and process in the European hotspot*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

- Hardion, L., Verlaque, R., Fridlender, A. & Vila, B. (2011) IAPT/IOPB chromosome data 11 (ed Marhold K). *Taxon*, **60**, 1221.
- Hardion, L., Verlaque, R., Baumel, A., Juin, M. & Vila, B. (2012) Revised systematics of Mediterranean *Arundo* (Poaceae) based on AFLP fingerprints and morphology. *Taxon*, **61**, 1217–1226.
- Hewitt, G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247–276.
- Hewitt, G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hewitt, G.M. (2011) Mediterranean peninsulas: the evolution of hotspots. In: *Biodiversity hotspots* (eds Zachos, F.E. & Habel, J.C.), pp. 123–147. Springer, Heidelberg.
- Huson, D.H. (1998) SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*, **14**, 68–73.
- Johnson, L.A. & Soltis, D.E. (1994) matK DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Systematic Botany*, **19**, 143.
- Jombart, T., Devillard, S. & Balloux, F. (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, **11**, 94.
- Kawecki, T.J. (2008) Adaptation to marginal habitats. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **39**, 321–342.
- Kučera, J., Marhold, K. & Lihová, J. (2010) *Cardamine maritima* group (Brassicaceae) in the amph-Adriatic area: A hotspot of species diversity revealed by DNA sequences and morphological variation. *Taxon*, **59**, 148–164.

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

- Lavergne, S., Hampe, A. & Arroyo, J. (2013) In and out of Africa: how did the Strait of Gibraltar affect plant species migration and local diversification? *Journal of Biogeography*, **40**, 24–36.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A.J. & Suchard, M.A. (2009) Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology*, **5**, e1000520.
- Magri, D., Vendramin, G.G., Comps, B., Dupanloup, I., Geburek, T. Gömöry, D., Latalowa, M., Litt, T., Paule, L., Roure, J.M., Tantau, I., van der Knaap, W.O., Petit, R.J. & de Beaulieu, J.L. (2006) A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist*, **171**, 199–221.
- Maselli, V., Hutton, E.W., Kettner, A.J., Syvitski, J.P.M. & Trincardi, F. (2011) High-frequency sea level and sediment supply fluctuations during Termination I: An integrated sequence-stratigraphy and modeling approach from the Adriatic Sea (Central Mediterranean). *Marine Geology*, **287**, 54–70.
- Médail, F. & Diadema, K. (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **36**, 1333–1345.
- Migliore, J., Baumel, A., Juin, M. & Médail, F. (2011) From Mediterranean shores to central Saharan mountains: key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *Journal of Biogeography*, **39**, 942–956.
- Parisod, C., Holderegger, R. & Brochmann, C. (2010) Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, **186**, 5–17.
- Pécricx, Y., Rallo, G., Folzer, H., Cigna, M., Gudín, S. & Le Bris, M. (2011) Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 3587–3597.

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

Petit, R.J., Csaikl, U.M., Bordacs, S., *et al.* (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, **156**, 5–26.

Quinn, L.D. & Holt, J.S. (2008) Ecological correlates of invasion by *Arundo donax* in three southern California riparian habitats. *Biological Invasions*, **10**, 591–601.

R Core Team (2011) R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna.

Rodríguez-Sánchez, F., Guzmán, B., Valido, A., Vargas, P. & Arroyo, J. (2009) Late Neogene history of the laurel tree (*Laurus* L., Lauraceae) based on phylogeographical analyses of Mediterranean and Macaronesian populations. *Journal of Biogeography*, **36**, 1270–1281.

Saltonstall, K. (2001) A set of primers for amplification of noncoding regions of chloroplast DNA in the grasses. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 76–78.

Surina, B., Schönswetter, P. & Schneeweiss, G.M. (2011) Quaternary range dynamics of ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, Campanulaceae) within the Balkan refugium. *Journal of Biogeography*, **38**, 1381–1393.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105–1109.

Takhtajan, A. (1986) Floristic regions of the world. University of California Press, Berkeley.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731–2739.

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

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

Vettori, C., Vendramin, G., Anzidei, M., Pastorelli, R., Paffetti, D., & Giannini, R. (2004) Geographic distribution of chloroplast variation in Italian populations of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **109**, 1–9.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407–4414.

Weiss, S. & Ferrand, N. (2007) Phylogeography of southern European refugia: evolutionary perspectives on the origins and conservation of European biodiversity. Springer, Amsterdam.

de Witte, L.C., Armbruster, G.F.J., Gielly, L., Taberlet, P. & Stöcklin, J. (2012) AFLP markers reveal high clonal diversity and extreme longevity in four key arctic-alpine species. *Molecular Ecology*, **21**, 1081–1097.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Appendix S1 Samples locations and genetic assignments

Appendix S2 GenBank accessions

Appendix S3 Histogram for Multi-Locus Lineages delimitation

BIOSKETCHES

Laurent Hardion is a PhD student in the Mediterranean Institute for Biodiversity and Ecology (IMBE, CNRS) at Aix-Marseille University. His research interests concern plant evolution, phylogeography, polyploidy, and systematics.

Régine Verlaque (IMBE) is a researcher who works on plant systematics, polyploid evolution, and biological conservation of endemic species in the Mediterranean.

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

Alex Baumel (IMBE) is an associate professor of Aix-Marseille University, working on Ecology and Evolution of plants mostly in Mediterranean ecosystems. He is also interested in the use of the knowledge about evolution and genetic diversity to improve conservation of biodiversity.

Bruno Vila (IMBE) is an associate professor of Aix-Marseille University and the curator of MARS Herbarium. He is interested in plant biogeography and systematics.

Author contributions: L.H. and B.V. planned the study and collected the plant material; L.H. and R.V. performed the lab work; L.H. and A.B. analysed the molecular data; the four authors led the writing.

Table 1 Characteristics of cpDNA sequences used for phylogenetic inferences on (a) the chronogram of *Arundo* and (b) the phylogeography of *A. plinii* (including *A. donaciformis*). Substitution models were defined for each sequence (a) and for the whole alignment (b) using

| | psaA-ORF | trnCF-rpoB | rbcL-psaI | trnS-psbD | trnT-trnL | total |
|-------------------------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|-------|
| (a) <i>Arundo</i> + outgroups | | | | | | |
| Length range (bp) | 926 | 1021 | 1015 | 829 | 799 | 4590 |
| Substitution model | HKY | HKY | HKY+G | TPM3uf | TPM1uf | - |
| Nb of substitutions | 30 | 53 | 62 | 43 | 61 | 249 |
| Nb of indels (cpSSR) | - | - | - | - | - | - |
| (b) <i>Arundo plinii</i> | | | | | | |
| Length range (bp) | 906 | 993 | 993 | 766 | 753 | 4411 |
| Substitution model | - | - | - | - | - | F81 |
| Nb of substitution | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 6 |
| Nb of indels (cpSSR) | 2(2) | 1(1) | 2(1) | 2(1) | 2(2) | 9(7) |

JMODELTEST 2.1.1.

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

Table 2 Discrete phylogeographic reconstructions of ancestral areas (AA) estimated for each node supported by >0.95 posterior probabilities (pp) on the maximum clade credibility (MCC) tree illustrating the phylogeography of *A. plinii* (Fig. 2c). Ancestral area probabilities >10% are given in brackets. Areas: D, Dalmatia; G, Greece; S, Sicily.

| Node | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------|-------------|------|------|-------------|-------------|------|-------------|------|------|
| pp | 1.00 | 0.45 | 0.49 | 1.00 | 0.96 | 0.40 | 0.98 | 0.22 | 0.26 |
| AA | S (29) | - | - | S (55) | S (25) | - | S (68) | - | - |
| | G (25) | - | - | G (23) | G (23) | - | G (25) | - | - |
| | D (19) | - | - | D (19) | D (26) | - | - | - | - |

Table 3 Genetic diversities among biogeographical regions and DAPC genetic clusters (in bold) using AFLPs. n, number of samples; MLLs, numbers of multi-locus lineages; F, number of fragments; PF, number of private fragment; %F, percentage of polymorphic fragments; *I*, Shannon index.

| | n | MLLs | F | PF | %F | <i>I</i> |
|------------------------------------|-----------|-------------|------------|-----------|-------------|----------------------|
| Balkan | 34 | 15 | 753 | 35 | 45.8 | 0.150 (0.006) |
| Dalmatia | 16 | 7 | 689 | 11 | 36.9 | 0.127 (0.006) |
| Greece | 18 | 8 | 704 | 17 | 37.0 | 0.125 (0.006) |
| Italy | 36 | 19 | 736 | 31 | 46.5 | 0.140 (0.006) |
| Liguria (<i>A. donaciformis</i>) | 16 | 1 | 561 | 0 | <1.0 | <0.01 (0.000) |
| North Italy | 20 | 10 | 658 | 4 | 30.5 | 0.108 (0.006) |
| Central Italy | 18 | 8 | 717 | 20 | 37.6 | 0.128 (0.006) |
| Sicily | 28 | 14 | 756 | 38 | 50.9 | 0.159 (0.007) |

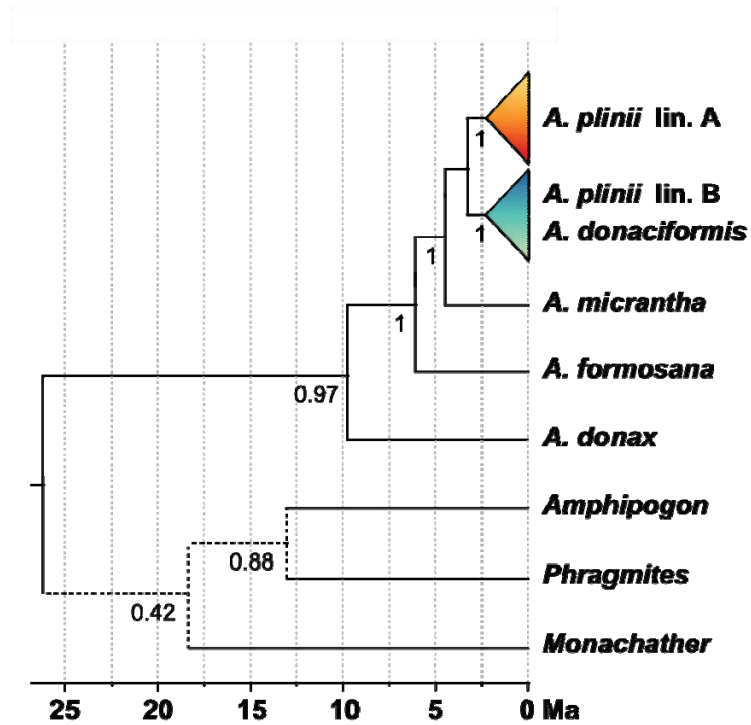


Fig. 1 Chronogram (Ma) based on cpDNA sequences, according to a maximum clade credibility (MCC) tree following a relaxed clock model with log-normal distribution of rates (BEAST 1.7.4). The two lineages of *A. plinii* are each grouped to distinguish their simultaneous diversification. Numbers below branches indicate Bayesian posterior probabilities.

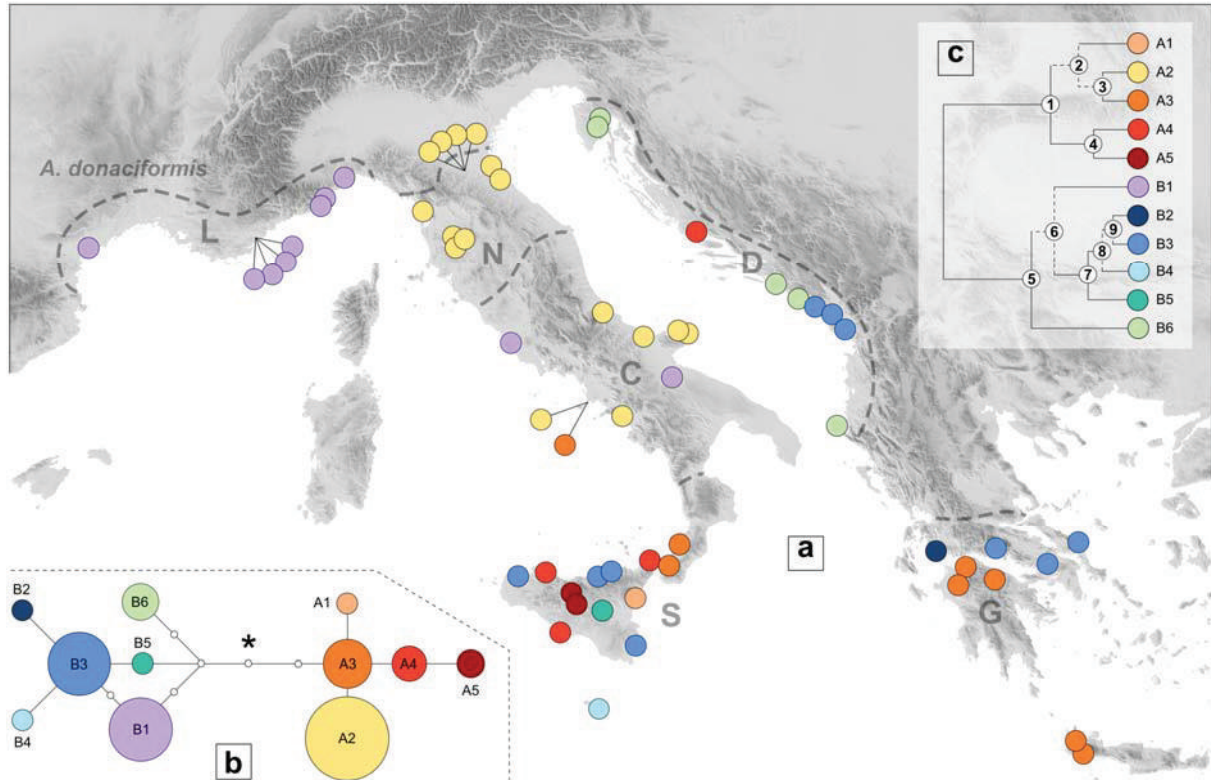


Fig. 2 (a) The geographical distribution and (b) a statistical parsimony network (TCS 1.21) of *A. plinii* and *A. donaciformis* cpDNA haplotypes. White circles indicate intermediate haplotypes not detected in the dataset and the asterisk (*) indicates the insertion of *A. micrantha*. (c) A maximum clade credibility (MCC) tree (BEAST 1.7.4) of *A. plinii* cpDNA haplotypes. Dashed lines indicate weakly supported bifurcations. Node numbers refer to the Bayesian posterior probabilities and the phylogeographic discrete reconstructions reported in Table 2. Warm colours denote lineage A, cold colours, lineage B; regions are labelled C, Central Italy; D, Dalmatia; G, Greece; L, Liguria; N, North Italy; and S, Sicily.

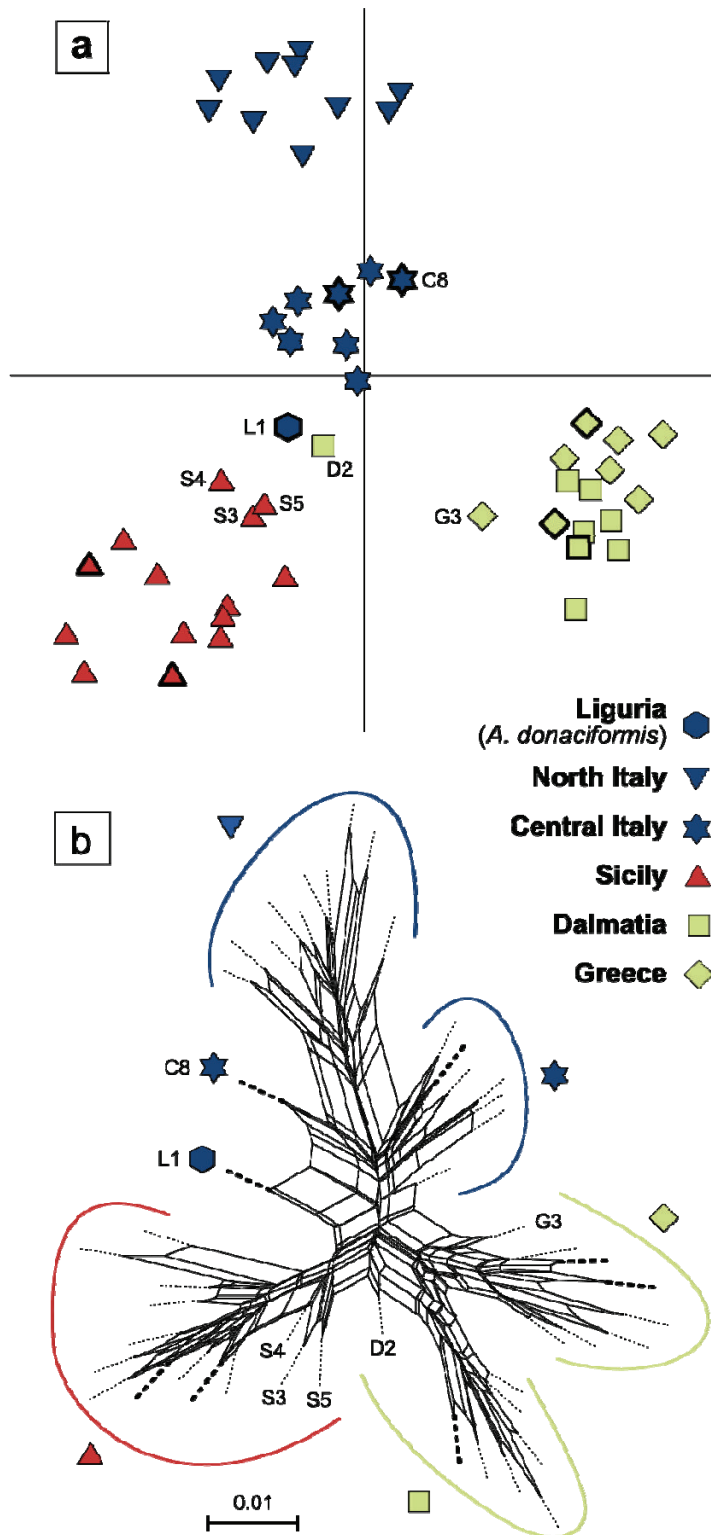


Fig. 3 (a) Principal coordinate (PCo) analysis based on Jaccard distances between the 47 multilocus lineages (MLLs) of *A. plinii* and *A. donaciformis* (L1) using AFLPs. The first two coordinates explain 16.1% (9.0% and 7.1%) of variance. (b) NeighborNet diagram based on Nei and Li's genetic distances between the 47 MLLs by using AFLPs (final branches truncated). Colours indicate DAPC genetic clusters. Symbols with bold outlines (a) and bold, dashed lines (b) indicate high polyploids ($2n = 108, 114$).

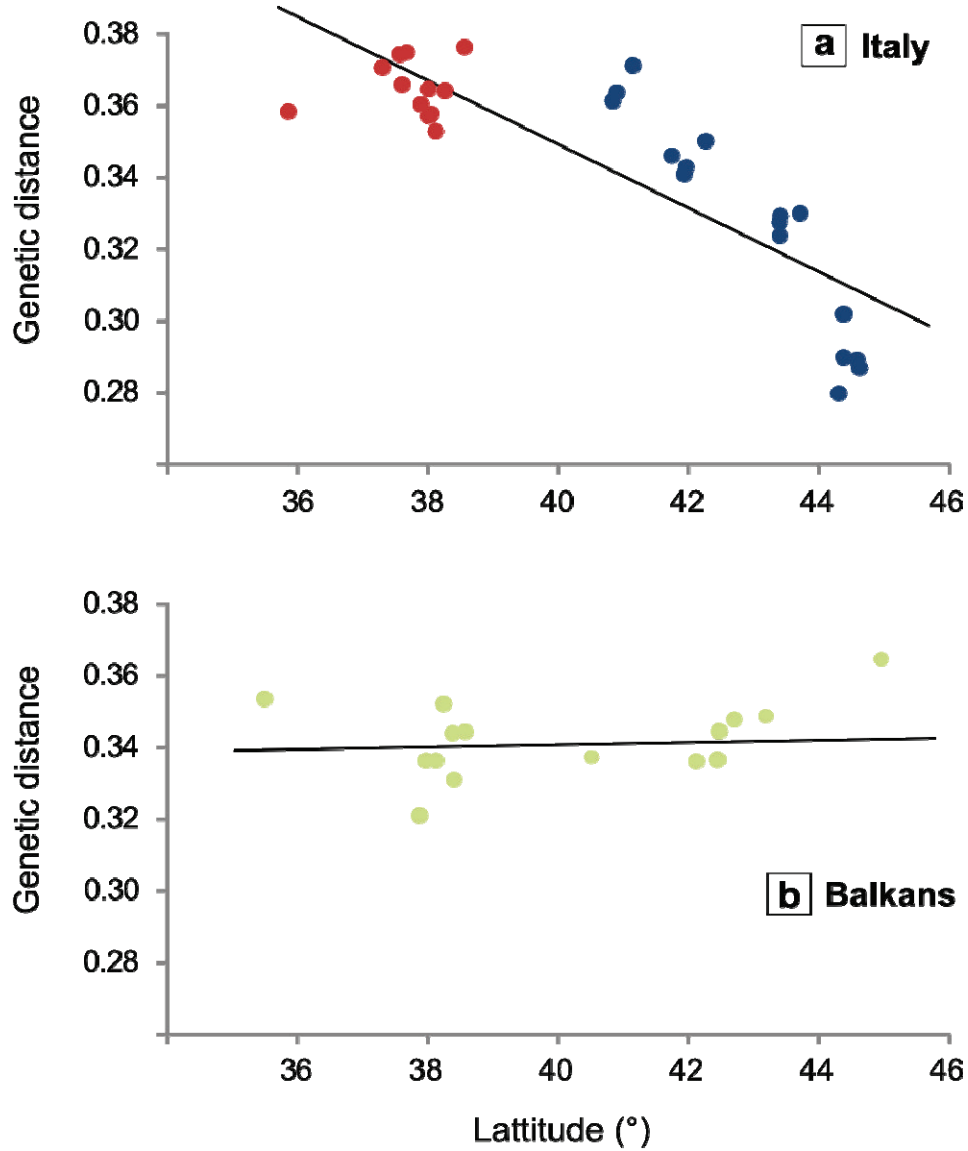


Fig. 4 Average genetic distance of each locality from the three nearest neighbours along the Italian (a) and Balkan (b) latitudinal gradients calculated using AFLPs. Colours indicate DAPC genetic clusters.

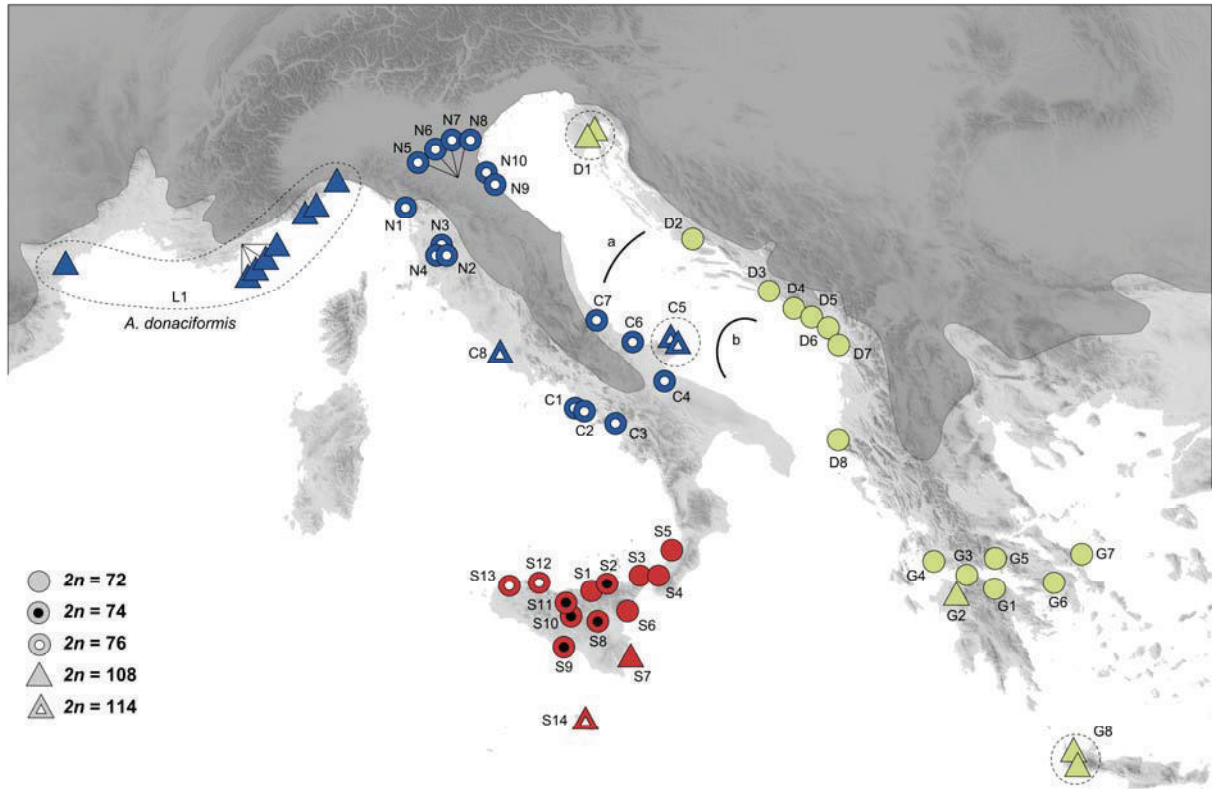


Fig. 5 Geographical distribution of the five cytotypes of *A. plinii* and *A. donaciformis*. Colours indicate DAPC genetic clusters. Dashed lines gather similar MLLs. Grey shading indicates the limit of the Mediterranean climate. The two solid lines denote (a) the -100 m bathymetric level; and (b) the continental margin, from -200 to -1000 m.

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

SUPPORTING INFORMATION

Appendix S1 Sample locations, collector, herbarium barcodes, cpDNA haplotypes, GenBank accession numbers, cpDNA haplotype combinations, MLL codes and cytotypes.

| Taxon | Locality | Country | Collector(s) | Herbarium barcode | Latitude | Longitude | Haplo | MLL | 2n |
|------------------------|-----------------|---------|----------------|-------------------|-----------|-----------|-------|-----|-----|
| <i>A. donaciformis</i> | Fréjus | France | Hardion | MARS00062 | 43°25'55" | 6°45'52" | B1 | L1 | 108 |
| <i>A. donaciformis</i> | Saint Raphaël | France | Hardion | MARS00063 | 43°27'47" | 6°47'52" | B1 | L1 | 108 |
| <i>A. donaciformis</i> | Puget / Argens | France | Hardion | MARS00064 | 43°26'38" | 6°42'28" | B1 | L1 | 108 |
| <i>A. donaciformis</i> | Les Arcs | France | Hardion | MARS00065 | 43°27'09" | 6°31'13" | B1 | L1 | 108 |
| <i>A. donaciformis</i> | Lespignan | France | Hardion | MARS00066 | 43°16'36" | 3°09'03" | B1 | L1 | 108 |
| <i>A. donaciformis</i> | Cervo | Italy | Hardion | MARS00067 | 43°55'38" | 8°07'37" | B1 | L1 | 108 |
| <i>A. donaciformis</i> | Andorra | Italy | Hardion | MARS00068 | 43°57'49" | 8°10'00" | B1 | L1 | 108 |
| <i>A. donaciformis</i> | Finale Ligure | Italy | Hardion | MARS00069 | 44°10'39" | 8°22'12" | B1 | L1 | 108 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Sirili | Greece | Vila | MARS00100 | 35°29'56" | 23°48'54" | A3 | G8 | 108 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Lauzakies | Greece | Vila | MARS00101 | 35°27'54" | 23°37'53" | A3 | G8 | 108 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Paralia Kimis | Greece | Hardion & Vila | MARS00102 | 38°34'16" | 24°07'31" | B3 | G7 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Sicyone | Greece | Hardion & Vila | MARS00103 | 37°58'18" | 22°44'32" | A3 | G1 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Kavassilas | Greece | Hardion & Vila | MARS00104 | 37°52'34" | 21°16'02" | A3 | G2 | 108 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Patras | Greece | Hardion & Vila | MARS00105 | 38°14'26" | 21°46'02" | A3 | G3 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Messolonghi | Greece | Hardion & Vila | MARS00106 | 38°22'42" | 21°28'37" | B2 | G4 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Levadia | Greece | Hardion & Vila | MARS00107 | 38°24'00" | 22°58'00" | B3 | G5 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Agios Stephanos | Greece | Hardion & Vila | MARS00108 | 38°07'30" | 23°50'06" | B3 | G6 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Napoli | Italy | Hardion & Vila | MARS00109 | 40°50'09" | 14°03'52" | A2 | C1 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Pozzuoli | Italy | Hardion & Vila | MARS00110 | 40°53'50" | 14°02'38" | A3 | C2 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Salerno | Italy | Fridlender | MARS03394 | 40°41'08" | 14°45'08" | A2 | C3 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Candela | Italy | Hardion & Vila | MARS00111 | 41°08'41" | 15°29'35" | B1 | C4 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Rodi Garganico | Italy | Hardion & Vila | MARS00112 | 41°55'58" | 15°55'16" | A2 | C5 | 114 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | San Menaio | Italy | Hardion & Vila | MARS03393 | 41°56'06" | 15°57'26" | A2 | C5 | 114 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Termoli | Italy | Hardion & Vila | MARS00113 | 41°57'55" | 14°59'46" | A2 | C6 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Lanciano | Italy | Hardion & Vila | MARS00114 | 42°16'09" | 14°27'04" | A2 | C7 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Ostia | Italy | Hardion & Vila | MARS00115 | 41°44'53" | 12°15'26" | B1 | C8 | 114 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Pisa | Italy | Hardion & Vila | MARS00116 | 43°42'34" | 10°22'32" | A2 | N1 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Montegabbro | Italy | Hardion & Vila | MARS00117 | 43°24'23" | 11°03'01" | A2 | N2 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | San Gimignano | Italy | Hardion & Vila | MARS00118 | 43°24'05" | 10°59'53" | A2 | N3 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Volterra | Italy | Hardion & Vila | MARS00119 | 43°23'43" | 10°52'54" | A2 | N4 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Bologne | Italy | Hardion & Vila | MARS00120 | 44°35'07" | 11°19'20" | A2 | N5 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Castel Maggiore | Italy | Hardion & Vila | MARS00121 | 44°37'49" | 11°18'30" | A2 | N6 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Sasso Marconi | Italy | Hardion & Vila | MARS00122 | 44°22'20" | 11°15'10" | A2 | N7 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Pianoro | Italy | Hardion & Vila | MARS00123 | 44°23'35" | 11°18'59" | A2 | N8 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Forli | Italy | Hardion & Vila | MARS00124 | 44°18'28" | 12°06'51" | A2 | N9 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Ravenna | Italy | Hardion & Vila | MARS00125 | 44°22'58" | 12°11'34" | A2 | N10 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Santo Stefano | Italy | Hardion | MARS00126 | 38°00'35" | 14°21'38" | B3 | S1 | 72 |

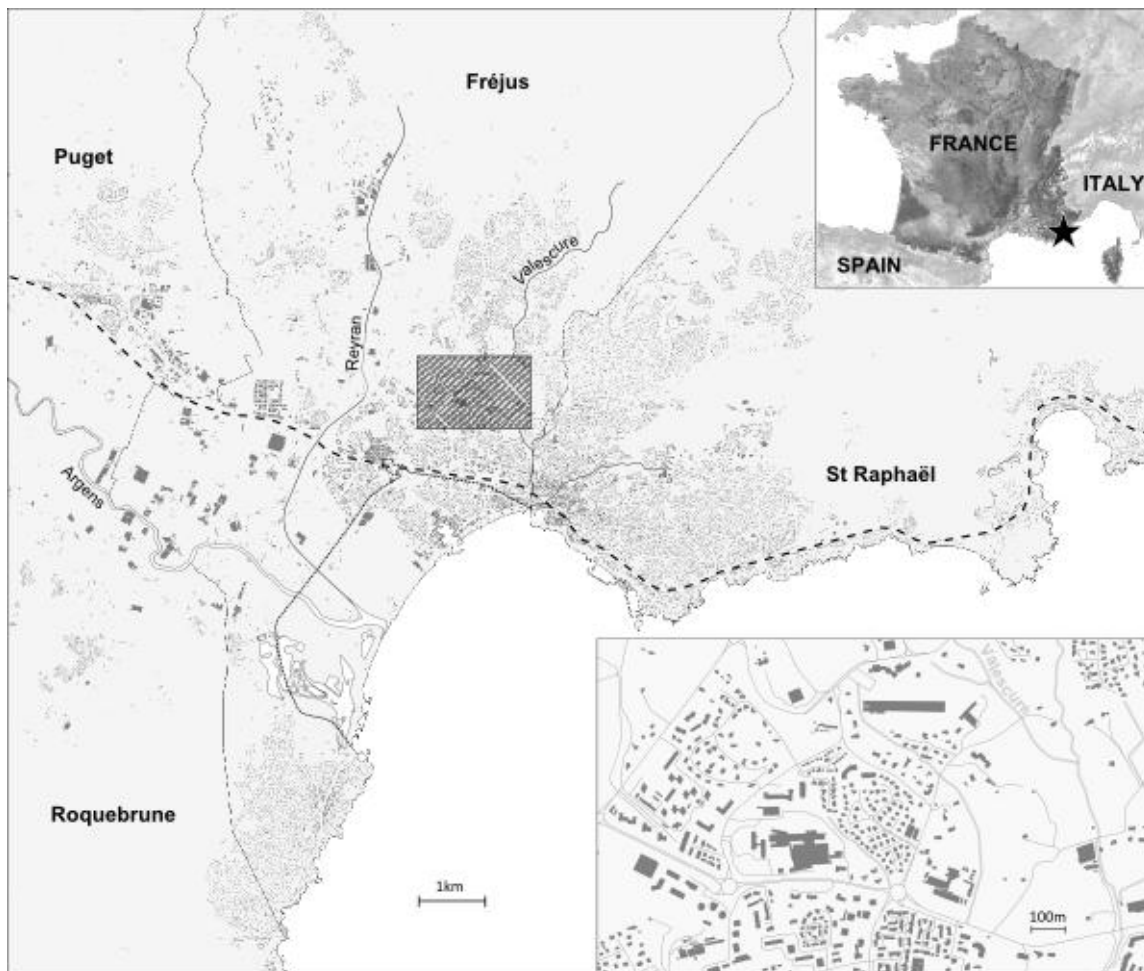
III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

| | | | | | | | | | |
|------------------------------|------------------|------------|---------------------|------------|------------|------------|----|-----|-----|
| <i>A. plinii</i> s.s. | Orto Liuzzo | Italy | <i>Hardion</i> | MARS00127 | 38°15'50" | 15°28'21" | A4 | S3 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Dinami | Italy | <i>Hardion</i> | MARS00128 | 38°33'38" | 16°04'54" | A3 | S5 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Siracusa | Italy | <i>Hardion</i> | MARS00129 | 37°18'31" | 15°06'26" | B3 | S7 | 108 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Enna | Italy | <i>Hardion</i> | MARS00130 | 37°34'44" | 14°17'12" | B5 | S8 | 74 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Agrigente | Italy | <i>Hardion</i> | MARS00131 | 37°19'13" | 13°35'10" | A4 | S9 | 74 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Scillato | Italy | <i>Hardion</i> | MARS00132 | 37°36'19" | 13°48'52" | A5 | S10 | 74 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Castellamare | Italy | <i>Hardion</i> | MARS00133 | 38°01'11" | 12°53'55" | B3 | S13 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Cannitello | Italy | <i>Hardion</i> | MARS03395 | 38°03'13" | 14°36'04" | A3 | S4 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Taormine | Italy | <i>Hardion</i> | MARS03396 | 37°53'27" | 15°19'04" | A1 | S6 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Resultano | Italy | <i>Hardion</i> | MARS03397 | 37°40'21" | 14°03'09" | A5 | S11 | 74 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Buffone | Italy | <i>Hardion</i> | MARS03398 | 38°03'13" | 14°36'04" | B3 | S2 | 74 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Palermo | Italy | <i>Fridlender</i> | MARS03399 | 38°04'42" | 13°22'31" | A4 | S12 | 76 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Brsec | Croatia | <i>Hardion</i> | MARS00099 | 45°11'07" | 14°14'31" | B6 | D1 | 108 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Moscenicka Draga | Croatia | <i>Karl</i> | MARS03400 | 45°14'27" | 14°14'60" | B6 | D1 | 108 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Split | Croatia | <i>Hardion</i> | MARS03401 | 43°27'53" | 16°35'05" | A4 | D2 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Dubrovnik | Croatia | <i>Hardion</i> | MARS03402 | 42°42'17" | 17°59'23" | B6 | D3 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Sutorina | Montenegro | <i>Hardion</i> | MARS03403 | 42°28'02" | 18°28'59" | B6 | D4 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Herceg Novi | Montenegro | <i>Hardion</i> | MARS03404 | 42°26'52" | 18°38'35" | B3 | D5 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Budva | Montenegro | <i>Hardion</i> | MARS03405 | 42°16'48" | 18°53'05" | B3 | D6 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Bar | Montenegro | <i>Hardion</i> | MARS03406 | 42°06'56" | 19°04'46" | B3 | D7 | 72 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Girgenti | Malta | <i>Gambin</i> | MARS00134 | 35°51'22" | 14°24'59" | B4 | S14 | 114 |
| <i>A. plinii</i> s.s. | Sazan | Albany | <i>Médail</i> | MARS03407 | 40°29'26" | 19°16'36" | B6 | D8 | 72 |
| <i>A. micrantha</i> | Golfe Juan | France | <i>Hardion</i> | MARS00075 | 43°33'48" | 7°04'08" | * | - | 72 |
| <i>A. formosana</i> | - | Taiwan | <i>Lyonnet</i> | MARS00045 | - | - | * | - | 72 |
| <i>A. donax</i> | Marseille | France | <i>Verlaque</i> | MARS00049 | 43°20'04" | 5°08'26" | * | - | 108 |
| <i>Monachather paradoxus</i> | Dalwallinu | Australia | <i>Hislop 1593</i> | CANB584872 | 30°16'41"S | 116°39'15" | * | - | - |
| <i>Amphipogon turbinatus</i> | Esperance | Australia | <i>Orchard 1578</i> | P02302787 | - | - | * | - | - |
| <i>Phragmites australis</i> | Marseille | France | <i>Verlaque</i> | MARS | 43°20'02" | 5°05'19" | * | - | - |

* see appendix S2

III. Phylogéographie d'*A. plinii* et origine d'*A. donaciformis* : Manuscrit E

IV. Conservation d'*Arundo donaciformis* à Fréjus



Synthèse détaillée

Annexes :

- **Manuscrit F** : Vila *et al.* *in press*. Espèce méditerranéenne menacée et aménagements urbains : le cas d'*Arundo plinii* à Fréjus. Livre blanc PIRVE (CNRS)
- **Manuscrit G** : Hardion *et al.* *en préparation*. Conservation of *Arundo donaciformis*
- **Manuscrit H** : Hardion *et al.* *en préparation*. Impact of polyploidy on in *Arundo*

IV. Conservation d'A. *donaciformis* à Fréjus

Synthèse détaillée

Après la révision taxonomique d'*A. plinii s.l.*, les populations françaises constituent désormais les principaux effectifs d'*A. donaciformis* (Hardion *et al.* 2012). De plus, la majorité de ces effectifs (70%) se situe sur la communauté d'agglomération de Fréjus-Saint Raphaël (CAFSR, Var, PACA), presque exclusivement en milieu urbain. Ainsi, cette géophyte, endémique rare cumule tous les handicaps menant vers la spirale de l'extinction. Loin d'être le seul taxon dans ce cas, *A. donaciformis* représente cependant un cas aggravé de la confrontation entre le développement urbain et la conservation de la biodiversité. Ces menaces d'extinction et les tensions entre les acteurs du développement urbain et de la protection de la nature nécessitent la mise en place d'un plan de conservation concerté.

Ainsi, nous avons mis en place un programme pluridisciplinaire de recherche où les sciences du vivant côtoient les sciences humaines, mêlant les outils et disciplines de génétique des populations, d'écologie, de SIG, d'urbanisme, de sociologie, d'ethnobotanique et d'archéologie dans le but d'élaborer un plan efficace pour la conservation de la canne de Fréjus. En l'absence de connaissances, même les plus élémentaires, relatives à l'espèce, nos principaux objectifs ont été :

- (1) de définir la distribution actuelle de l'espèce par un inventaire détaillé,
- (2) d'étudier la diversité génétique de l'espèce et sa biologie de la reproduction afin de localiser les populations à protéger en priorité,
- (3) de définir un préférendum écologique de l'espèce afin de guider d'éventuelles transplantations ou restaurations,
- (4) de préciser les relations entre la distribution actuelle et passée de l'espèce avec les structures de la ville et son interférence avec les projets urbains futurs,
- (5) d'enquêter, en sociologie et en ethnologie, sur la perception de l'espèce afin de proposer des stratégies de sensibilisation en vue de sa conservation.

Les parties concernant l'écologie et la biologie de l'espèce et sa distribution dans l'espace urbain ont été menées dans le cadre de la présente thèse, tandis que l'aspect sociologique de ce travail a été dirigé par Carole Barthelemy (LPED, UMR 151, Aix-Marseille Université) et l'analyse de la morphologie urbaine réalisée par Jean-Noël Consales

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

(TELEMME, UMR 7303, Aix-Marseille Université). L'ensemble des travaux réalisés à Fréjus s'intègre dans le Programme Interdisciplinaire de Recherche Ville-Environnement.

IV.1. Distribution actuelle de l'espèce

Un inventaire complet des stations d'*Arundo donaciformis* a été réalisé dans le cadre du stage de master 1 de Flora Druetz et Kévin Lhoyer (2012) sur Fréjus. Les contours de toutes les stations connues (source: F. Walicki, E. Schmalz et J.M. Prieur – Ville de Fréjus) ou découvertes lors de l'étude ont été géo-référencées à l'aide d'un GPSMAP 60CSx (Garmin l'Europe, Southampton, Royaume-Uni). Ces données ont été compilées afin de construire un système d'information géographique exhaustif de la répartition de l'espèce.

Réalisée dans l'intégralité de l'aire de distribution du taxon, l'étude a également permis de caractériser de manière qualitative, mais exhaustive, plusieurs variables environnementales. Des données qualitatives relatives au sol, à la pente, à l'exposition, à l'altitude et à la luminosité ont été évaluées (Cf. 3.1.2. Analyses qualitatives). De plus, le pourcentage de surface perturbée par station a été estimé à l'aide de classes de perturbation (classe 1 à 5 correspondants à 0-5, 5-25, 25-50, 50-75 ou 75-100 % de surface perturbée) et qualifié (*e.g.* fauchage, piétinement). Enfin, chaque fois que cela était possible, nous avons également noté les traces de transplantations accidentelles.

Sur la communauté d'agglomération de Fréjus-Saint-Raphaël, *A. donaciformis* couvre 119 420 m² (Figure 10). Le SIG met en évidence trois points majeurs : (i) La répartition de l'espèce est largement fragmentée, cependant les stations sont en majorité réparties le long de deux rivières du Valescure, mais aussi le long des structures linéaires comme les routes et les marges de champs cultivés. Ces résultats soulignent l'importance du réseau hydrique (cours d'eau naturels et / ou canaux) et le rôle prépondérant de l'utilisation des terres (agriculture par rapport à l'urbanisation) dans la répartition de l'espèce ; (ii) Le second constat majeur concerne l'absence d'*A. donaciformis* au sud du rivage antique, notamment marqué par la "Lanterne d'Auguste" (Excoffon & Bonnet 2013) ; (iii) Enfin, nous avons observé un grand nombre de stations déconnectées du cœur de la distribution de l'espèce et situées sur des structures modernes de la fin du XIX^{ème} et du XX^{ème} siècle, comme les voies ferrées, les routes et les remblais ou gravats associés aux travaux d'aménagement.

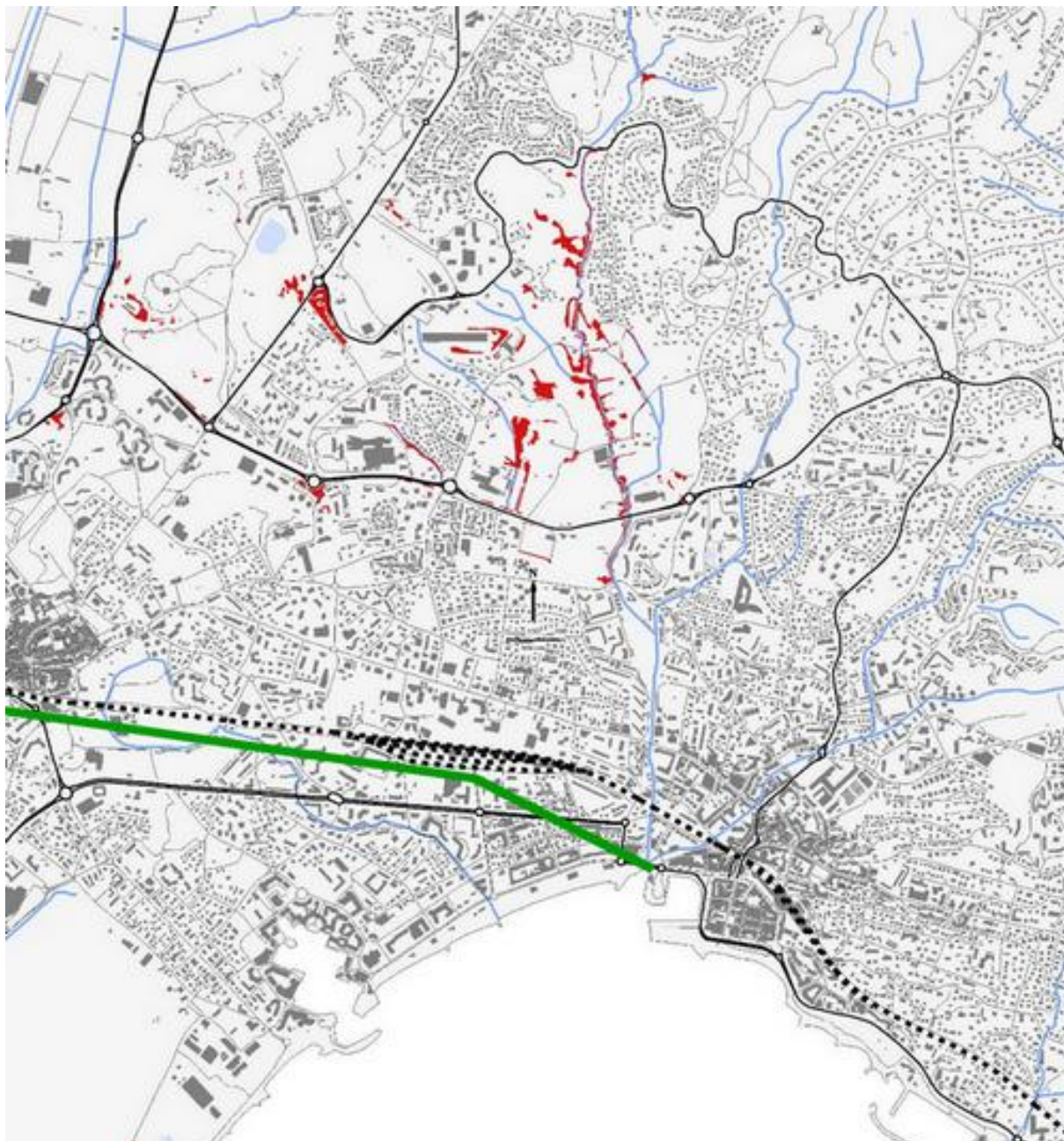


Figure 10. Distribution de la canne de Fréjus (en rouge) sur le territoire de la CAFSR en 2012. Ligne verte, rivage antique (Bony *et al.* 2011).

Sur les 314 parcelles référencées dans la distribution de l'espèce, seulement 20% ne sont pas impactées par l'Homme. Un quart des stations présentaient une surface perturbée à plus de 75% lors de nos visites. Pas moins de 19 sites ont été identifiés avec certitude comme ayant été accidentellement transplantés lors de déplacement de sol, de par la présence de remblais sous les rhizomes, ou par le positionnement sur des monticules de terre artificiels (Planche 1).

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus



Planche 1. Stations d'*A. donaciformis* fortement perturbées ou transplantées accidentellement par des travaux d'aménagement urbain.

IV.2. Biologie de la conservation

Diversité génétique. Une étude de la diversité génétique d'*A. donaciformis* a été entreprise afin de cibler les populations les plus diversifiées et les plus originales à protéger en priorité, en partant du postulat selon lequel la diversité indiquée par les marqueurs AFLP reflète le potentiel adaptatif de l'espèce (Reed & Frankham 2003). Au vue de la forte clonalité dans ce genre, cette recherche s'est basée sur un pré-échantillonnage de 30 individus comprenant à la fois les stations marginales dans la distribution de l'espèce et les plus menacées par les projets d'aménagement de la ville selon le service Environnement (Walicki 2008). Les quatre couples d'amorces ont permis de générer 144 fragments, dont 4.2%

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

polymorphes. Basé sur des échantillons témoins analysés à l'aveugle, le seuil de divergence inter-génotypes a été évalué à 2.1%, valeur en accord avec celles trouvées dans la littérature (Bonin *et al.* 2004). Ce seuil n'a pas permis de définir plus d'une lignée multi-locus parmi les 30 échantillons. La diversité de Nei a été estimée à 0.006, soulignant l'absence de diversité génétique parmi ces 30 échantillons. Cette uniformité génétique ne permet donc pas de définir des stations à conserver en priorité. Si cela peut simplifier la mise en place d'un plan de conservation, l'existence d'un seul génotype peut être un handicap adaptatif pour la pérennité de l'espèce face aux perturbations et stress croissants en milieu urbain. D'après nos observations initiales, cette absence de diversité pouvait être liée à la non fructification du taxon. En effet, cette espèce n'a jamais produit de caryopses *in situ* sur la base de 210 fleurs examinées (Hardion *et al.* 2012). Puisque ce statut non-fructifère semble assez courant au sein du genre *Arundo* (e.g. *A. donax*), mais qu'il n'est pas non plus généralisé (e.g. *A. plinii*, Fig. 11), nous avons donc cherché à savoir quels phénomènes biologiques pouvaient l'expliquer.

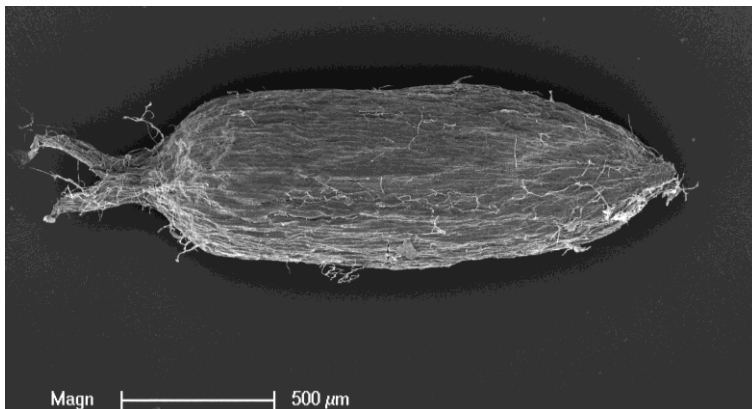


Figure 11. Caryopse d'*A. plinii* à 12X à Bologne (Emilie-Romagne, Italie).

Biologie de la reproduction. En fonction de la littérature et de nos résultats, les génotypes d'*Arundo* possédant un niveau de ploïdie de $2n = 18X \sim 108$ (i.e. *A. donax* méditerranéen et invasif, *A. donaciformis* et *A. plinii* à 18X) s'avèrent tous non-fructifères. A l'inverse, les niveaux de ploïdie de $2n = 12X \sim 72$ se révèlent fructifères (i.e. *A. donax* asiatique, *A. plinii* à 12X et *A. formosana*), à l'exception d'*A. micrantha*. Or, le caractère non-fructifère d'*A. donaciformis* peut constituer une réelle menace pour sa persistance à long terme, limitant la migration (espèce anémochore) et le brassage génétique (espèce anémophile) de cette endémique à aire restreinte.

Afin de comprendre l'absence de reproduction sexuée chez les hauts niveaux de polyplôïdie, plusieurs expériences ont été menées associant aux observations de la microgamétogenèse (i.e. formation du pollen), des estimations de la viabilité des grains de pollen,

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

leurs taux de germination, des dénombrements de caryopses dans les taches monoclonales et dans des mélanges *ex situ* de génotypes. Par ailleurs, à l'aide de techniques de cytogénétique moléculaire (*i.e.* FISH, AgNORs), nous avons recherché des marqueurs potentiels de phénomènes de diploïdisation des génomes. Les objectifs de ces expérimentations ont été : (i) d'identifier les étapes potentiellement défaillantes lors de la micro-gaméto-genèse, (ii) de chercher des indices de diploïdisation de ces taxons hauts polyploïdes, et (iii) de tester leur patrons d'auto-incompatibilité.

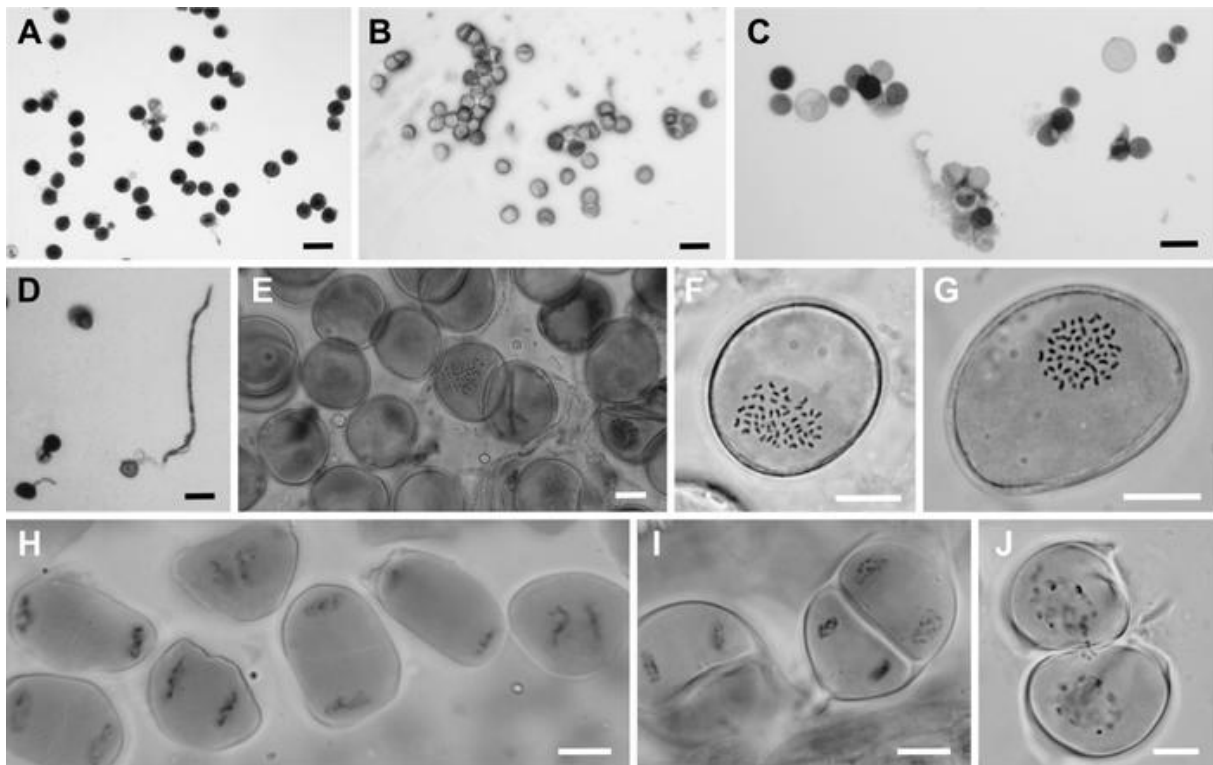


Figure 12. Observations de méioses, de mitoses polliniques, de la viabilité pollinique et de la germination du pollen. A, pollen normal d'*A. plinii* à $2n = 12X$; B, pollen vide d'*A. donax* ($2n = 18X$); C, pollen hétérogène d'*A. micrantha* ($2n = 12X$); D, germination du pollen d'*A. plinii* à $2n = 18X$; E, mitose pollinique normale (métaphase, $n = 54$) d'*A. donaciformis* ($2n = 108$); F, mitose pollinique normale (métaphase, $n = 56$) d'*A. plinii* à $2n = 18X \sim 108$; G, mitose pollinique (métaphase, $n=54$) d'*A. donax* ($2n = 18X \sim 108$); H, méiose régulière (anaphase I) d'*A. plinii* à $2n = 12X$; I, méiose (anaphase II) d'*A. plinii* à $2n = 12X$; J, échange de chromosomes entre des méiocytes d'*A. micrantha* ($2n = 12X$). Barre noire, 50 μm ; barre blanche, 10 μm .

Les résultats ne semblent pas soutenir l'effet négatif direct du haut niveau de ploïdie sur la fertilité. Cet impact est généralement visible durant la méiose par la formation de multivalents entraînant des divisions très inégales du matériel génétique (Bretagnolle & Thompson 1992). Or, une majorité de métaphases de mitoses polliniques à $n \sim 54$ (*i.e.* nombre

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

normal) ont été observées pour tous les hauts polyploïdes, malgré quelques nombres aneuploïdes (Figure 12). Si toutes les espèces et tous les cytotypes ont produit un pollen viable, les taux de viabilité sont très variables selon les espèces, et corrélés à la germination des grains, et non au niveau de ploïdie. Les plus fortes valeurs de viabilité pollinique et de germination s'observent uniquement chez *A. plinii* à 12X et 18X, et *A. donaciformis* (18X).

Les résultats en cytogénétique moléculaire soutiennent la diploïdisation des *Arundo* à partir de cytotypes à $2n = 12X$ ou même à des niveaux inférieurs, avec 4 régions d'ADN ribosomal pour chaque marqueur (5S et 45S, FISH) chez les individus à $2n = 12X$. Les différences entre les cytotypes à 12X et 18X sont arithmétiquement proportionnelles au niveau de ploïdie (4/4 régions vs. 6/6 régions), à l'exception d'*A. donaciformis* qui possède le même nombre de régions d'ADN ribosomal (5S et 45S, FISH) que les cytotypes à 12X. Ce résultat pourrait témoigner de remaniements génomiques passés ou en cours chez l'endémique ligurienne. Enfin, *A. donaciformis* et les hauts cytotypes d'*A. plinii* deviennent fructifères en mélange *ex situ* avec différents génotypes allopatriques, ce qui n'est pas le cas *in situ*. Ce résultat suggère une auto-incompatibilité chez les *Arundo*, entraînant l'absence de caryopse *in situ* dans les stations génétiquement uniformes. Ces observations montrent donc la fertilité potentielle d'*A. donaciformis*, et ouvrent sur d'autres expériences, telles que l'identification des limites (intra- ou interspécifiques) de son auto-incompatibilité. Enfin, ces nouvelles données sur la biologie de la reproduction des *Arundo* confirment la stérilité d'*A. donax* en méditerranée, mais aussi d'*A. micrantha*, tous deux producteurs de pollen hautement anormaux et développant pas de tube pollinique.

IV.3. Niche écologique

En l'absence de diversité génétique, nous avons tenté de caractériser la niche écologique d'*A. donaciformis* afin de désigner les stations à préserver en priorité et d'aiguiller d'éventuelles transplantations ou restaurations de stations. En plus des variables abiotiques (pente, altitude, exposition...) et biotiques (flore), un intérêt particulier a été porté aux variables édaphiques en raison du statut de géophyte de l'espèce.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

Analyse quantitative des sols. Afin de définir l'enveloppe physico-chimique favorable à *A. donaciformis* des analyses quantitatives fines ont donc été réalisées sur les sols des 50 plus grandes stations de cette espèce à Fréjus (n=47), ainsi qu'à Lespignan (n=2, Hérault, France), Cervo et Andorra (n=2, Ligurie, Italie). A titre de comparaison, des analyses complémentaires de sols ont aussi été effectuées sur 31 stations d'*A. plinii s.s.* et 17 stations d'*A. micrantha* dans le reste du bassin méditerranéen. Pour ce faire, l'horizon superficiel (profondeur 0-30cm) du sol exploré par ce taxon géophyte a été étudié. En position centrale de chaque station, environ 500 g de sol ont été recueillis entre 10 et 30 cm environ. Un total de 14 variables quantitatives ont été mesurées (INRA, France) : l'analyse granulométrique (5 variables, NF X 31-107), le contenu de la matière organique, le carbone, l'azote et du carbonate de calcium dans les sols secs et de l'eau dans le sol frais (ISO 10694, 13878 et 10693), le pH (ISO 10390), la capacité d'échange cationique (ISO 23470) et la conductivité (Tableau 1).

Tableau 1. Moyennes et écart-types des 14 variables quantitatives décrivant les sols occupés par *A. donaciformis* à Fréjus (n=47), à Lespignan (n=2, Hérault, France), à Cervo et à Andorra (n=2, Ligurie, Italie). Les unités non-indiquées sont en g/kg de poids sec, sauf l'eau, en g/kg de poids frais, le pH et le ratio C/N, sans unité.

| Variabiles | Moyenne et écart-type |
|--|------------------------------|
| Argile (< 2 µm) | 149 ± 90.4 |
| Limon fin (2-20 µm) | 140.3 ± 78.1 |
| Limon grossier (20-50 µm) | 79.4 ± 44.7 |
| Sable fin (50-200 µm) | 135.3 ± 55.0 |
| Sable grossier (200-2000 µm) | 495.9 ± 215.6 |
| Eau (/poids frais) | 84.6 ± 44.3 |
| Matière organique | 22.0 ± 16.6 |
| Carbone organique (C) | 13.0 ± 9.6 |
| Azote (N) | 0.89 ± 0.76 |
| C/N | 15.3 ± 3.6 |
| CaCO ₃ | 66.8 ± 101.5 |
| pH | 7.9 ± 0.67 |
| Conductivité (ms/cm) | 0.17 ± 0.06 |
| Capacité d'échange cationique (cmol+/kg) | 11.9 ± 5.1 |

L'endémique ligure semble occuper des sols à texture plus grossière que son espèce-sœur, *A. plinii s.s.*, avec une plus grande variation de pH et de plus faibles concentrations en CaCO₃, (géologie cristalline et position littorale de Fréjus, ria de l'Argens). Cependant, il est

important de considérer le biais de la distribution restreinte d'*A. donaciformis* par rapport à l'Italo-Balkanique *A. plinii* et la circum-méditerranéenne *A. micrantha* (Figure 13). En plus de définir une enveloppe physico-chimique favorable à *A. donaciformis*, les analyses fines de sols ont déjà permis de caractériser l'adéquation d'un site proposé par le service environnement de la communauté d'agglomération de Fréjus-Saint-Raphaël dans le cadre d'une transplantation.

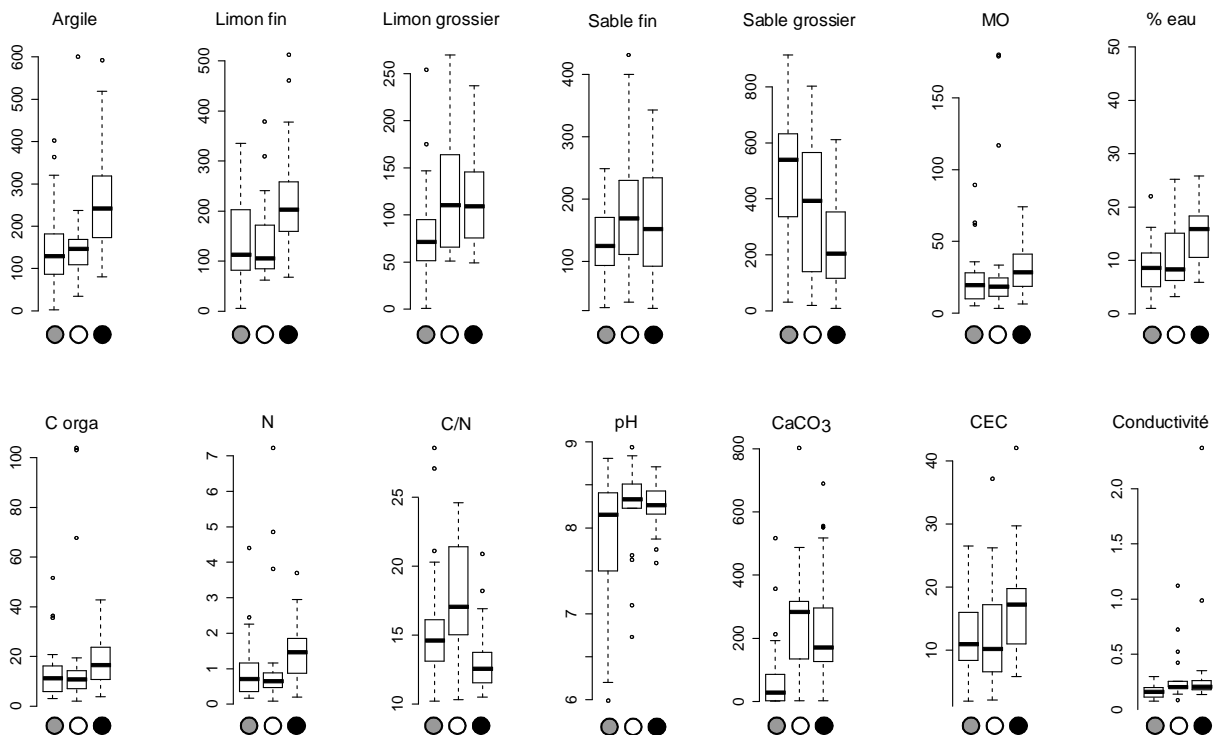


Figure 13. Analyses de sols des stations d'*A. donaciformis* (ronds gris, 44 stations), comparées à celles d'*A. micrantha* (ronds blancs, 17) et d'*A. plinii s.s.* (ronds noirs, 31).

Analyses qualitatives. Afin d'obtenir un ensemble représentatif quant à l'écologie du sol d'*A. donaciformis*, plusieurs variables qualitatives ont été estimées lors de l'inventaire de la distribution de l'espèce. Ainsi les paramètres suivants ont été décrits entre 10 et 30 cm de profondeur : la couleur du sol, sa structure (forme des agrégats : Baize & Jabiol 1995 ; Baize 2004), sa granulométrie (pourcentages respectifs de sables, limons et argiles selon l'approche Herody), sa pierrosité (absence/présence/abondance en graviers/cailloux/pierres/blocs), sa compacité (test du couteau), sa teneur en carbonate de calcium (CaCO_3 , test HCl ; notice STIPA : INRA-IRAT, 1982), son pH (test papier pH) et sa teneur en matière organique (Tableau 2). De plus, la teneur en eau, $(P \text{ frais} - P \text{ sec}) / P \text{ frais}$, a été calculée quantitativement pour l'ensemble des sols.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

Tableau 2. Pourcentages des 314 stations par modalités pour chaque variable environnementale qualitative.

| Variables | Modalités | % | Variables | Modalités | % |
|--------------------------------------|-------------------|----------------|---|------------------------------|----------|
| Altitude | - 10 < x < 10 | 47 | Blocs | Absence | 80.2 |
| | 10 < x < 30 | 34.2 | | Présence | 18.2 |
| | 30 < x < 50 | 16.6 | | Abondance | 1.6 |
| | > 50 | 2.2 | Pierres | Absence | 50.8 |
| Exposition | Sud | 12.1 | | Présence | 40.6 |
| | Est | 10.2 | | Abondance | 8.6 |
| | Nord | 8.9 | | Cailloux | Absence |
| | Ouest | 7.7 | Présence | | 49.8 |
| | nulle | 61 | Abondance | | 30.4 |
| Luminosité | ombre | 1.9 | Graviers | Absence | 4.5 |
| | mi-ombre | 27.2 | | Présence | 50.2 |
| | exposé | 70.9 | | Abondance | 45.4 |
| Strate dominante | Arboré | 8.9 | Texture (USDA) | Argileuse | 4.2 |
| | Arbustif | 1.6 | | Limoneuse | 28.4 |
| | Herbacée | 89.5 | | sableuse | 8.3 |
| | | | | Équilibrée | 59.1 |
| Pente | < 10° | 43.1 | Forme des éléments grossiers | Aplati anguleux | 6.7 |
| | 10 < x < 23° | 27.8 | | Aplati sub-anguleux | 3.8 |
| | 23 < x < 45° | 19.5 | | Sphérique anguleux | 23.1 |
| | > 45° | 9.6 | | Sphérique sub-anguleux | 54.8 |
| | | | | Sphérique arrondi | 4.2 |
| Matière organique | Absence | 9.9 | | Non déterminé | 7.4 |
| | Présence | 56.5 | Structure des éléments grossiers | Grumeleux | 80.5 |
| | Abondance | 33.5 | | Polyédrique | 16 |
| | | Sans structure | | 3.5 | |
| [CaCO₃] (test HCl) | Absence (aucune) | 31 | Porosité (aération du sol) | Absence | 3.5 |
| | Présence (légère) | 15.3 | | Présence | 36.1 |
| | Abondance (forte) | 53.7 | | Abondance | 60.4 |
| pH (papier pH) | < 4 | 2.2 | Compacité (pénétration lame) | Meuble (entière sans effort) | 1.6 |
| | 4 < x < 5 | 6.4 | | Peu compact (avec effort) | 52.1 |
| | 5 < x < 6 | 70.6 | | Compact (incomplètement) | 29.4 |
| | 6 < x < 7 | 15.3 | | Massif (< 2 cm) | 16.9 |
| | > 7 | 5.4 | | | |
| Couleur (code Munsell) | Rouge-brun 2.5R | 0.6 | | | |
| | Brun-rouge 5YR | 4.8 | | | |
| | Brun 7.5YR | 92 | | | |
| | Brun-jaune 10YR | 1.6 | | | |

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

Une analyse des correspondances multiples (ACM ; figure 14) a été ensuite menée sur l'ensemble des 18 variables environnementales qualitatives. Une fois la meilleure représentation en plan principal obtenue, les variables caractéristiques du développement ont été superposées sur le plan principal de l'ACM, et des tests de corrélation de Pearson ont été calculés entre les deux axes principaux et les variables du développement, ainsi qu'avec la teneur en eau des sols. Toutes ces analyses ont été faites dans R2.14.1 (R Core Team 2013).

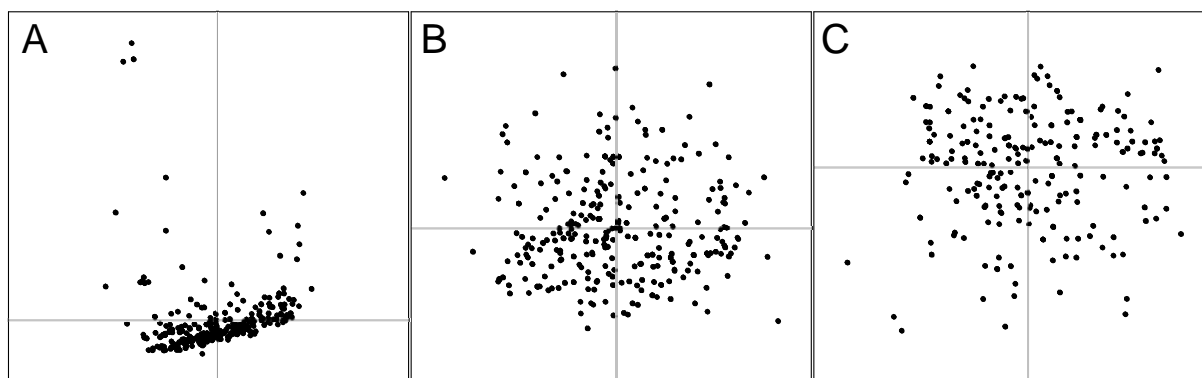


Figure 14. Premiers plans principaux des analyses de correspondances multiples des 18 variables environnementales qualitatives : A, sur l'ensemble des stations (n=313) ; B, sans les stations extrêmes à texture sableuse (n=293) et C, sans les stations fauchées (n=221).

Le premier plan principal de l'ACM présente une très faible résolution du nuage de points, essentiellement due aux valeurs extrêmes des stations à texture sableuse (n=20 ; figure 14A). Une fois ces quelques sites extraits du jeu de données, le nuage de points montre un étalement important, témoignant d'une bonne représentation de l'information distinguant les points (Figure 14B). Afin de superposer les variables du développement de la canne, les stations fauchées (n = 72) ont été enlevées de l'analyse, sans détérioration de la résolution (Figure 14C). Le plan principal obtenu représente sur l'axe horizontal les variables de pierrosité et de matière organique, et sur l'axe vertical la structure, la texture, et l'aération du sol (Figures 14C & 15). L'ensemble de ces analyses permet de conclure qu'*A. donaciformis* se développe dans des sols à la texture sablo-argileuse, sablo-limoneuse...c'est-à-dire plutôt drainants. La canne de Fréjus pousse aussi principalement sur des sols neutres (pH = 7,9) et relativement fertiles.

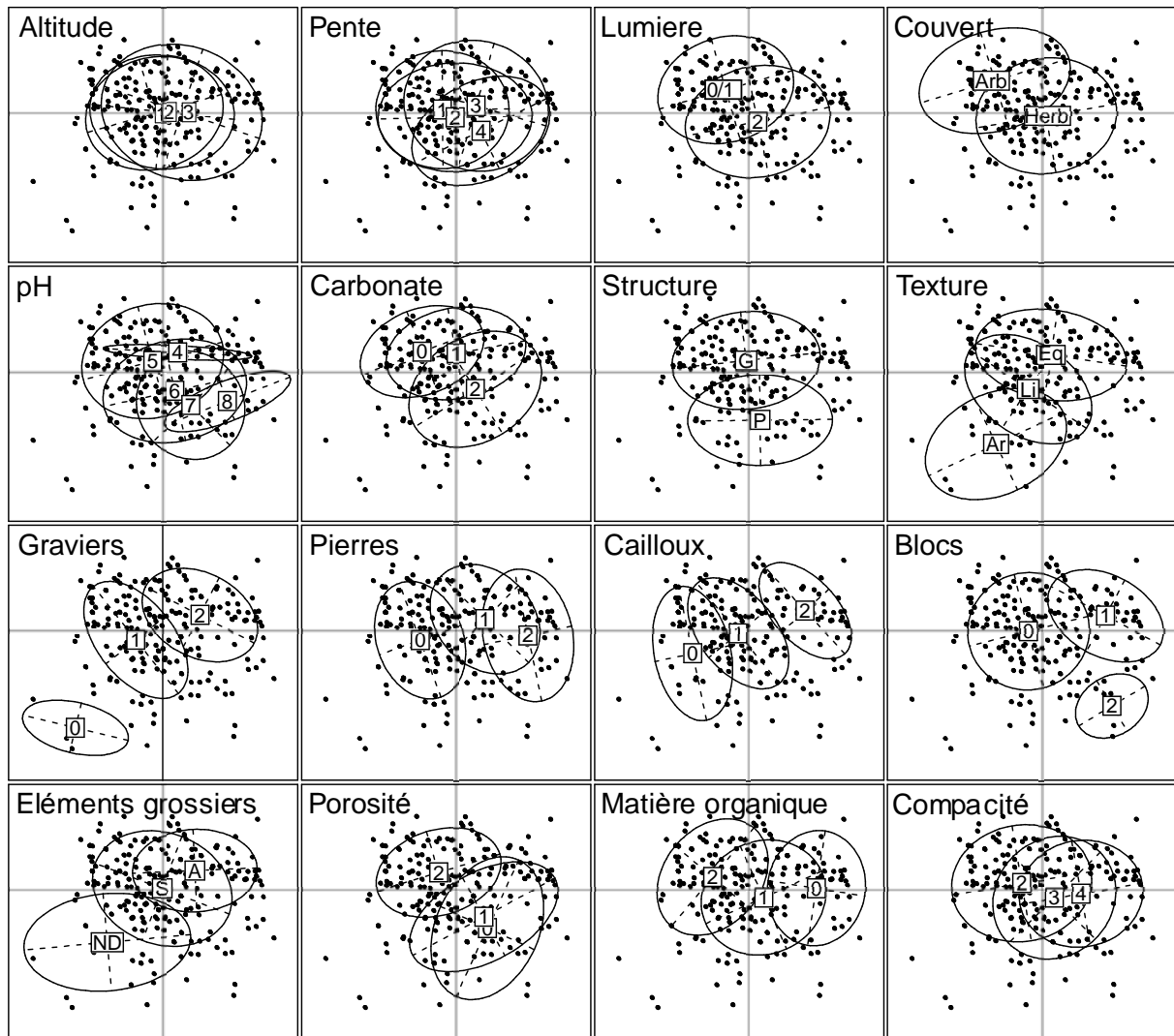


Figure 15. Distribution des modalités de chaque variable environnementale qualitative sur le plan principal de l'ACM (n=221; Figure 14C). Descriptif des modalités dans le tableau S1 (Données supplémentaires). 0/1/2, absence/présence/abondance.

Corrélations entre l'environnement de la plante et son développement. Afin de définir les facteurs environnementaux qui influencent le développement de la plante, des estimateurs de la croissance et de la productivité de l'espèce ont été quantifiés. Il s'agit des densités de tige et de panicules au m² (calculées sur 4 m²), ainsi que la hauteur moyenne des cinq plus grands chaumes. Enfin, le pourcentage (en cinq classes) de surface perturbée et la nature de cette perturbation ont été relevés pour chaque station, afin d'estimer le degré d'impact des activités humaines sur les stations d'*A. donaciformis*. La superposition des variables quantitatives du développement de la canne avec les variables environnementales ne montrent pas de patrons explicatifs clairs (Figure 16).

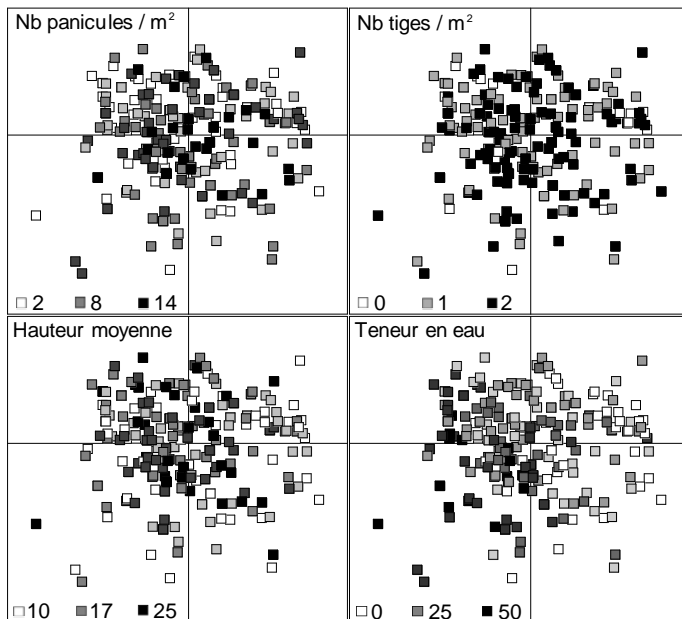


Figure 16. Projections des variables quantitatives du développement et de la teneur en eau sur le premier plan principal de l'ACM (Figure 14C). Le nombre de tiges par m² a été transformé en variable qualitative absence (0), présence (1) et abondance (2). Présentation de ces données sous forme de box-plot dans la figure 18.

Confirmée par les coefficients de corrélations (Figure 17), cette absence de corrélation peut s'expliquer par le manque de résolution des descripteurs environnementaux. Cependant, la forte corrélation de la teneur en eau ($r = 0,472$; $p < 0,001$; variable quantitative non prise en compte dans l'ACM) avec l'axe horizontal de l'ACM valide la description des sols réalisée par l'ACM. *A. donaciformis* semble donc peu sensible aux variations environnementales au sein de son aire actuelle, ou du moins à celles mises en évidence par les variables estimées.

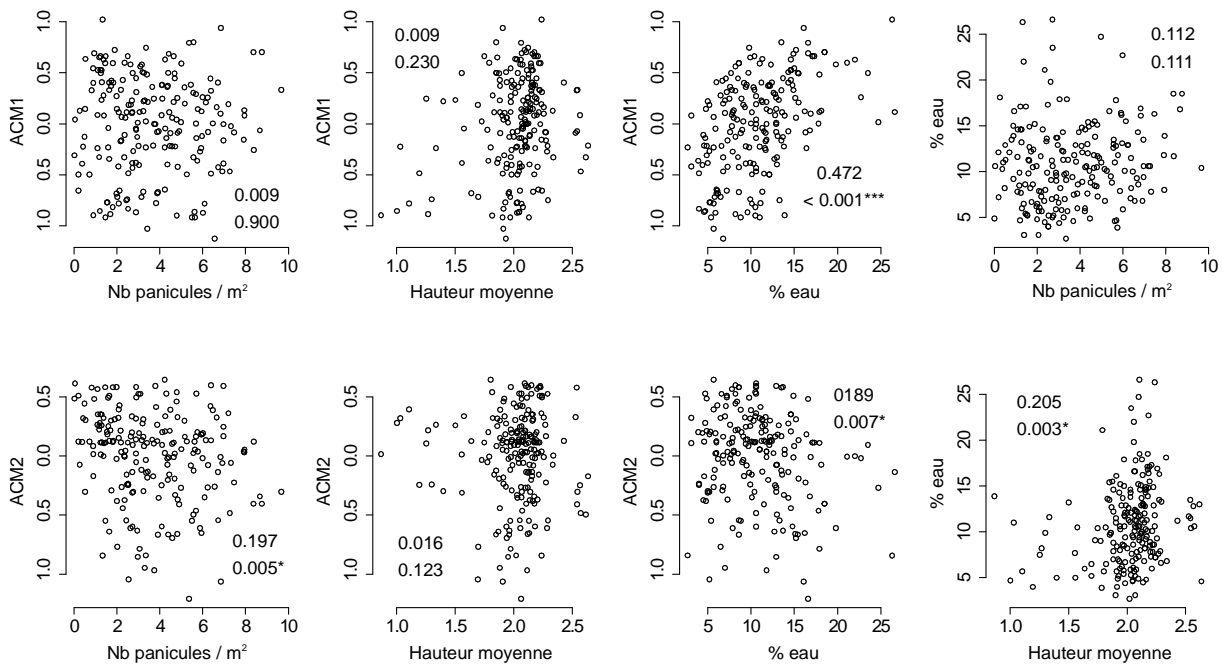


Figure 17. Corrélations (r de Pearson et p -value) entre les variables quantitatives du développement, du pourcentage en eau, et des axes principaux de l'ACM (Figure 14C).

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

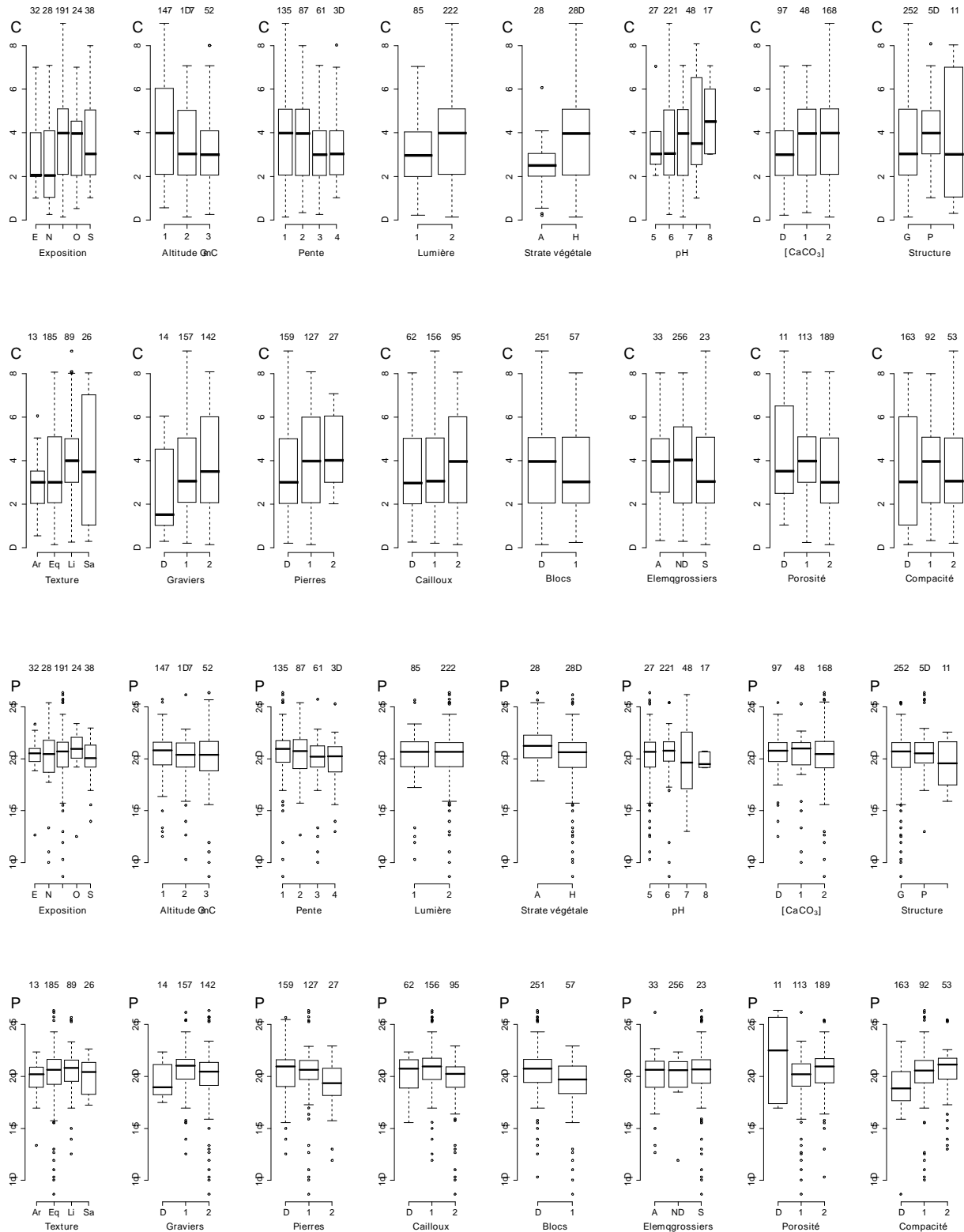


Figure 18. Box-plots des variables quantitatives du développement de la canne selon les modalités de chaque variable qualitative environnementale. P, nombre moyenne de panicule par m^2 ; C, hauteur moyenne des chaumes.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

Flore compagne des peuplements d'*A. donaciformis*. Afin de caractériser la flore accompagnant *A. donaciformis*, 30 relevés floristiques détaillés ont été effectués à l'échelle du territoire de la commune (CAFSR). Ce travail a été réalisé grâce aux compétences de Daniel Pavon (IMBE). Les données de terrain ont été recueillies au printemps (avril 2012 et mai 2013), période au cours de laquelle la plupart des espèces sont bien visibles. Les stations échantillonnées ont été sélectionnées sur la base de la superficie des stations d'*A. donaciformis*, mais aussi en fonction de la diversité des milieux observés, et notamment en incluant des sites protégés pour leur intérêt patrimonial (*e.g.* ZNIEFF, Natura 2000). Ces inventaires floristiques ont été réalisés dans des placettes de 100 m². Le recouvrement des espèces végétales présentes dans les placettes a été coté (de 1 à 5). L'analyse des données relatives à 30 relevés floristiques ne permet pas d'identifier une structuration particulière, si ce n'est la sur-représentation de la flore mésophile rudérale parmi 26 relevés, où dominent les *Vicia*, *Bromus* et *Avena* (Figure 19 ; planche 2). De plus, quelques stations caractérisent deux autres milieux très différents : une formation arbustive de type maquis à *Cistus* (n = 3), et un milieu humide à *Juncus* et *Cyperus* représenté par une seule station. Cette dernière correspond d'ailleurs au site receveur (*i.e.* le bassin écrêteur du Castelas) de la seule transplantation officielle d'*A. donaciformis* réalisée par le service environnement de Fréjus en 2008.

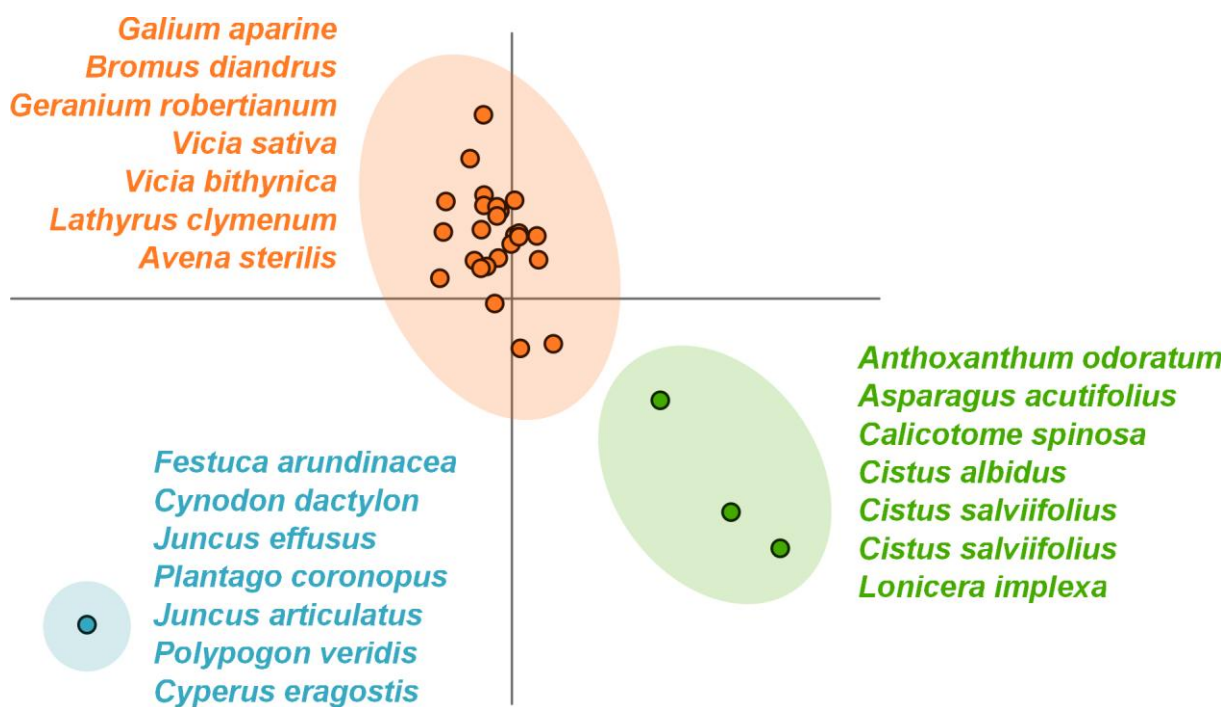


Figure 19. Premier plan principal de l'analyse factorielle des correspondances sur les 30 relevés floristiques (7.8 et 7.4% de l'inertie totale), et les sept espèces les plus communes dans chaque groupe.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus



Planche 2. Stations d'*A. donaciformis* en milieux semi-naturels et ruraux.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

Diversité des milieux occupés par *A. donaciformis*. Si le manque de variabilité génétique d'*A. donaciformis* pourrait suggérer un faible potentiel adaptatif, ce constat est compensé par une large amplitude écologique, comme le suggère la diversité des habitats occupés par l'espèce. Généralement, *A. donaciformis* se trouve dans des milieux rudéraux anthropisés représentés par des talus de bord de cours d'eau à régime méditerranéen, où elle semble fixer les berges, mais aussi en bordure de champs, plus ou moins éloignés d'une source d'eau ou sur les canaux d'irrigation et de drainage. A ce titre, la zone la plus remarquable est celle du vallon de Valescure (Planche 2). On retrouve également la canne de Fréjus dans quelques habitats naturels très contrastés, tels que les lagunes et arrière-plages des étangs de Villepey (site Natura 2000), un oued à *Nerium* de l'Estérel (zone ZNIEF), ou en limite de sous-bois type maquis et pinède (Planche 3).

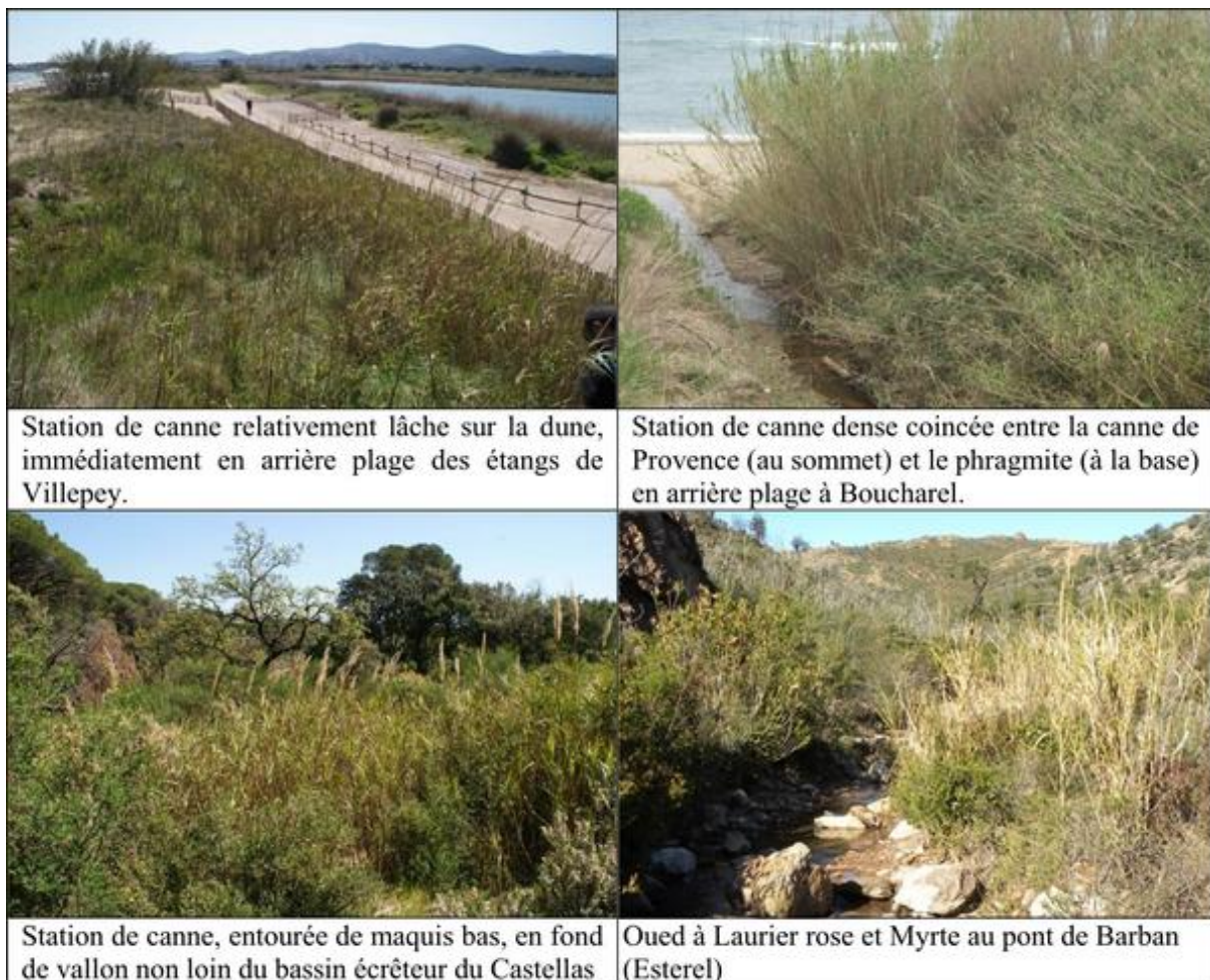


Planche 3. Stations d'*A. donaciformis* au caractère naturel remarquable.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

En plus de ces milieux naturels et semi-naturels, l'espèce se rencontre aussi dans des milieux artificialisés comme les bords de route et d'autoroute, les voies ferrées et divers monticules de terre (Planche 4). Ces milieux artificialisés résultent de deux processus distincts. Premièrement, ils peuvent être issus du transport et du dépôt de terre exogène sur le site où se trouve l'actuelle station. Dans ce cas, la terre contenait des rhizomes qui ont reformé une station sur le lieu du dépôt. Cela révèle par ailleurs une destruction au moins partielle de la station d'origine. Deuxièmement, ces stations artificialisées peuvent résulter de la dénaturation *in situ* d'une station originelle par les travaux d'aménagement. D'après nos observations de terrain, de nombreuses petites stations périphériques sont à mettre en lien direct avec les déplacements de terre lors des travaux d'aménagement. D'ailleurs, les quelques stations naturelles à caractère patrimonial sont peut-être concernées. Ainsi, la présence de l'espèce dans un oued à *Nerium* semble plus liée au remblai exogène d'un sentier pédestre en amont qu'au cours d'eau, et la station Nord de l'étang de Villepey pousse quant à elle sur une strate de bitume enfouie (Planche 1).

IV.4. Relations entre la distribution actuelle et passée de l'espèce avec les structures de la ville et de son interférence avec les projets urbains futurs

Pour compléter notre étude sur la distribution actuelle de l'espèce, une comparaison diachronique dans un focus urbain d'étude comprenant près de la moitié de sa distribution actuelle (41.4%, *i.e.* 70 188m²) a été réalisée sur la base d'une cartographie effectuée vingt ans plus tôt par le Professeur Lavagne (1991). Ces cartes ont été numérisées et compilées dans le SIG. **L'analyse diachronique de la distribution de l'espèce démontre qu'*A. donaciformis* a perdu plus de la moitié de sa distribution centrale en 20 ans, en passant de 184 000 à 70 188m²** (Figures 2 et 3, manuscrit G).

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

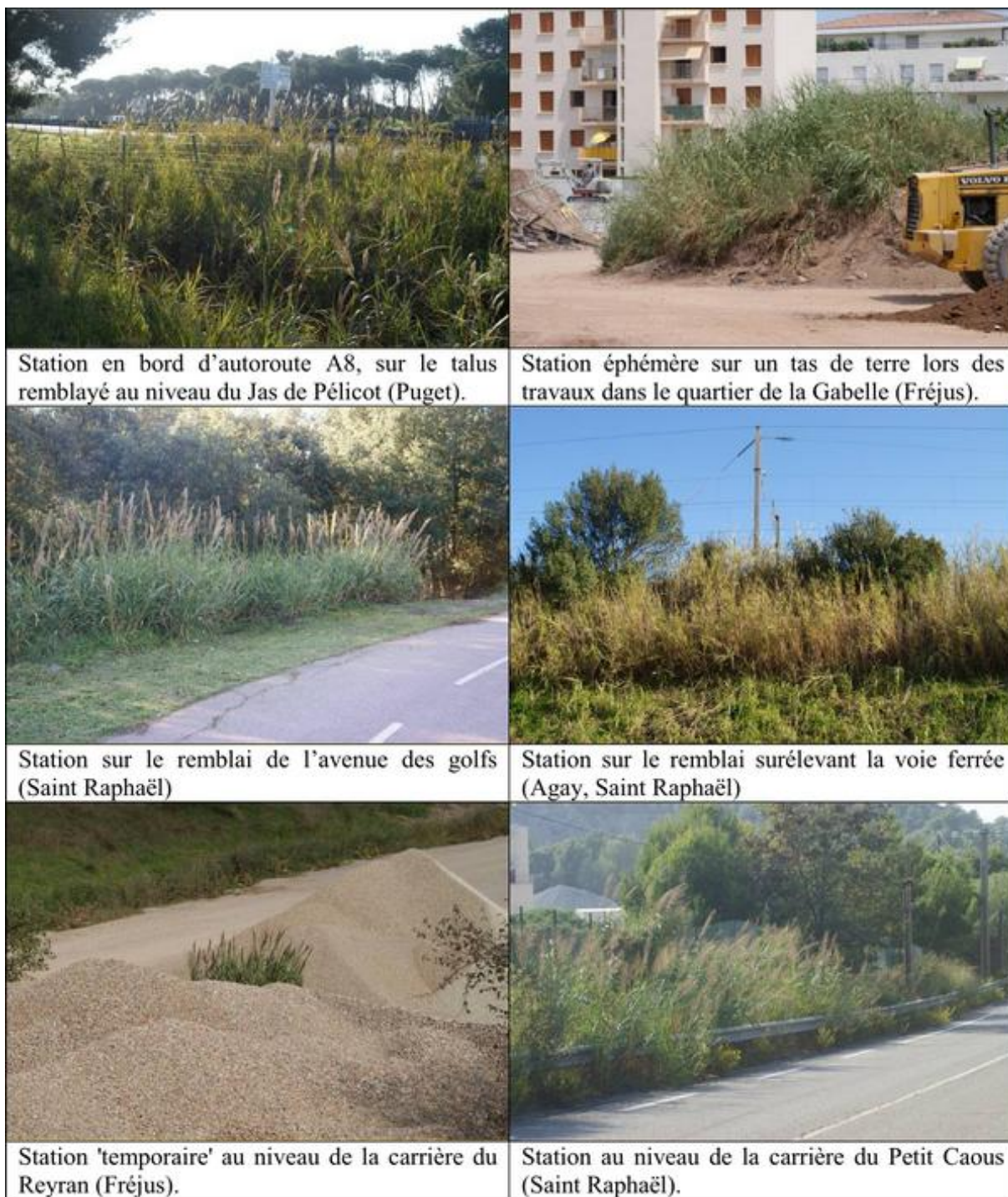


Planche 4. Stations d'*A. donaciformis* résultant de transplantations accidentelles de rhizomes sur des sites sans doute artificiels.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

Afin d'expliquer l'évolution de cette distribution au cours du temps, nous avons analysé plusieurs photographies aériennes. Ceci nous a permis d'élargir notre fenêtre temporelle et de disposer d'une analyse rétrospective de l'utilisation des terres depuis presque un siècle. Pour ce faire, nous avons donc distingué dans l'occupation du sol sur les photographies aériennes : les terres cultivées, les zones ouvertes abandonnées ou semi-naturelles, les espaces boisés, les infrastructures routières et le bâti (Figure 4, manuscrit G). Les surfaces recouvertes par ces différentes catégories ont été calculées (en m² et %) pour chaque photographie aérienne (Tableau 1, manuscrit G). Les photographies aériennes de 1926 et 1949 mettent en évidence l'importance des terres agricoles qui recouvraient respectivement 70,4 et 69,3% de l'aire étudiée. Le taxon se maintenait certainement sur les marges des parcelles cultivées comme cela s'observe encore aujourd'hui sur de rares sites (Planche 2). Les photos aériennes mettent également en évidence des zones peu végétalisées à caractère semi-naturel probablement impropres à la culture à cette époque et qui couvraient respectivement 17,1 et 13,3%. C'est sur la photographie aérienne de 1970 que l'on identifie un changement très important dans l'usage des terres. Sur cette image, les terres cultivées passent de 69,3 à 52,7% alors que les surfaces bâties sont multipliées par 4 en passant de 3,7 à 16,1%. Ces changements sont à mettre en lien avec la modification des pratiques agricoles et la pression de l'urbanisation croissante en périphérie du noyau villageois. Le second changement radical apparaît sur la photographie aérienne de 1991 où les terres agricoles n'occupent plus que 11,7% de la surface étudiée, tandis que les surfaces bâties représentent 25,7% et les milieux ouverts atteignent 47,2%. La photographie aérienne de 2010 confirme les observations relevées en 1991: les terres cultivées reculent encore pour ne plus recouvrir que 6,9% (contre 70,4 en 1926), alors que les surfaces bâties explosent pour atteindre 48% des surfaces de la zone étudiée. Cette forte augmentation des surfaces bâties est à mettre en lien avec la chute drastique des surfaces des zones à caractère semi-naturel ne couvrant plus que 26,6%.

Mises en relations avec la distribution diachronique d'*A. donaciformis* et son préférendum écologique pour les milieux ouverts non-cultivés, ces données nous informent indirectement sur la distribution de l'espèce durant le XX^{ème} siècle. Ainsi, la régression de moitié du pourcentage de milieux ouverts de 1991 à 2010 (de 47.7 à 26.6%) correspond à celle de l'espèce (de 10.7 à 4.5%). Après plusieurs siècles de persistance en marges des parcelles agricoles dominant le paysage de Fréjus, *A. donaciformis* a dû connaître une

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

expansion à partir des années d'après-guerre et suite à la déprise agricole. A l'origine contenue en limite de champs qu'elle devait contribuer à marquer et à fixer, elle a sans doute pu coloniser ces terres meubles abandonnées grâce à la croissance de ses rhizomes. Après cette courte période, témoignant de sa résilience de plusieurs siècles d'agriculture, *A. donaciformis* a fortement régressé sous la pression de l'urbanisation et ne se rencontre aujourd'hui plus que dans les zones non-constructibles.

Si nous considérons maintenant le seul critère urbanistique, les superficies de canne de Fréjus qui ont disparu entre 1991 et 2010 ont été remplacées par des zones pavillonnaires et des zones d'activités diverses. La majorité des effectifs qui subsistent se trouvent dans les espaces à caractère naturel et dans les zones agricoles (Figure 2, manuscrit F).

Comme nous l'avons déjà observé pour la distribution de la canne de Fréjus en relation avec la ligne de rivage antique, l'analyse urbanistique souligne que la D100 marque aussi une limite importante à la progression de la canne de Pline au sud de la commune. Le long de cet axe routier, la canne se trouve, en effet, dans un entre-deux géographique (jusqu'alors organisé en plusieurs chenaux, le Valescure est, à ce niveau, canalisé en un seul chenal) et urbanistique (entre les zones d'habitat collectif et les extensions pavillonnaires les plus proches du centre-ville) (Consales 2012).

IV.5. Perception de l'espèce par la population locale

Les enquêtes sociologiques conduites auprès de personnes impliquées dans la conservation la canne de Fréjus mettent en évidence deux discours bien distincts qui permettent de comprendre le statut ambigu de l'espèce au sein de la CAFSR (Planche 5). D'un côté, la plante évoque la rareté, l'endémisme, la vulnérabilité : « *C'est un taxon endémique, c'est à dire qu'on ne va trouver qu'en France... ensuite, qui a quand même une certaine résistance si on ne le détruit pas. Voilà, donc peut-être qu'elle a des potentialités par elle-même. Comme je dis toujours une espèce, elle peut avoir toute la génétique ou la diversité génétique, face à un bulldozer personne n'est capable de résister* » (Femme, Laboratoire de recherche) ».

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

A l'opposé, cette plante est vue comme une espèce résistante : « *Il en repousse partout* » (Homme, Service intercommunal Environnement)... « *C'est vraiment très, très tenace* » (Homme, Service local Espaces Verts)... « *Moi, je pense que c'est une espèce qui a les reins solides, la Canne de Pline* » (Homme, Association de protection de la nature) ;

- ou même considérée comme une espèce envahissante : « *C'est la mauvaise herbe qui fait « chier » les personnes qui nettoient les bords de route. C'est la plante qui ré-envahit les parkings qu'on a goudronnés, ça perfore les goudrons* » (Homme, Association de protection de la nature) ; « *Ça fait soixante ans on a toujours vu hein. Alors... Ça repousse toujours. Y a des étés que c'est sec comme tout on dirait que c'est mort, c'est tout ratatiné machin et tout et tout. On s'est dit ça y est cette fois elles vont crever. Elles repoussent putain... Rien du tout : dès qu'il repleut...* » (Homme, Agriculteur) ;

- et synonyme de lieu abandonnés, non entretenus où l'on jette tout et n'importe quoi : « *Et puis pour beaucoup de gens qui ont des belles stations près de chez eux dans le cadre d'espaces verts qu'on leur a demandé de garder, c'est l'endroit où les mobylettes démontées vont se foutre, où les rats pullulent, où les souris pullulent... Voilà pour les yeux des gens c'est ça. C'est de la merde* » (Homme, Association de protection de la nature).



Planche 5. Illustrations des perceptions d'*A. donaciformis* par les acteurs de sa conservation

A. donaciformis est donc perçue comme une espèce en danger dont les populations ont fortement régressé sous l'urbanisation, mais aussi comme une espèce résistante dont le maintien dans le réseau urbain ne fait aucun doute (Figure 20). Certaines personnes comparent même la canne de Fréjus à une espèce invasive et indésirable tant sa vigueur végétative paraît importante. Ainsi, *A. donaciformis* oscille entre deux représentations

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

contradictoires: une espèce vigoureuse et résistante ou qui régresse face à l'urbanisation. La première vision concerne les acteurs en charge de la conservation de la faune et de la flore (acteurs régionaux) alors que la seconde concerne les acteurs de l'aménagement urbain (services municipaux). Si pour les premiers la canne de Fréjus constitue un patrimoine naturel en danger qu'il convient de conserver, pour les seconds, elle demeure une contrainte à l'aménagement urbain.

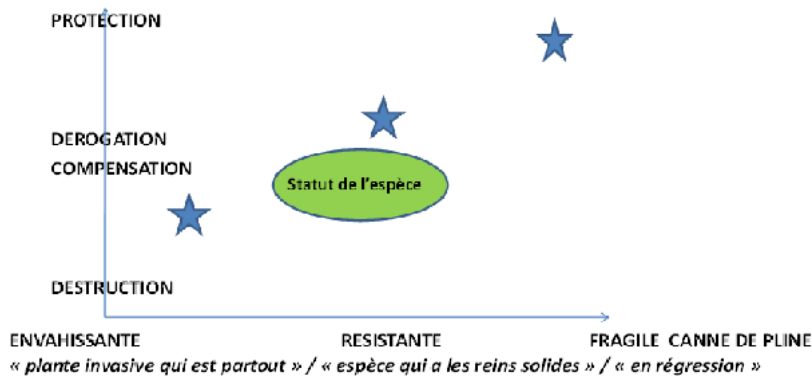


Figure 20. Evocations de l'espèce et de sa prise en charge (Barthélémy *et al.* 2011).

IV.6. La canne de Fréjus, illustration des nouveaux défis en biologie de la conservation

Au début des années 1970, plusieurs écologues constatent l'extinction de nombreuses espèces due à l'impact des activités anthropiques durant le 20^{ème} siècle (Ehrlich & Holdren 1971). Face à cette « crise de la biodiversité », des mesures de conservation ciblant des espaces naturels puis des espèces furent progressivement mises en place. Dans ce contexte, la biologie de la conservation a été fondée, afin d'acquérir des connaissances scientifiques sur les espèces menacées et ainsi d'optimiser leur conservation. Cependant, de sérieux problèmes apparurent dans l'organisation de ces recherches et surtout dans leurs applications. Nous détaillons ici les trois principaux écueils qui limitent le succès des plans de conservation, en les confrontant à notre modèle d'étude.

Tout d'abord, le **biais taxonomique** semble prépondérant dans toutes les synthèses bibliographiques en biologie de la conservation (Martin-Lopez *et al.* 2008). Ainsi, la grande majorité (69%) des sujets d'étude porte sur des vertébrés (soit 3% des espèces vivantes) et parmi eux, plus des 2/3 visent les oiseaux et les mammifères (Bonnet *et al.* 2002). La raison

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

principale de ce déséquilibre réside dans notre perception pour le moins anthropocentrique de la nature (Czech *et al.* 1998 ; Wilson *et al.* 2007). La conservation d'espèces emblématiques ou patrimoniales, d'assez grandes tailles et proches de l'Homme (par la génétique ou l'affectif) s'avère largement mieux financée que celle des innombrables autres espèces rares ou menacées dépourvues de ces caractéristiques (Metrick & Weitzman 1996 ; Restani & Marzluff 2001). Il existe donc un cercle vicieux entre l'avis du grand public, les politiques budgétaires et le travail des scientifiques influençant fortement les sujets d'étude pour la Conservation (Martin-Lopez *et al.* 2008). Plusieurs indicateurs semblent bien plus pertinents pour sélectionner les taxons menacés à protéger en priorité, d'abord les catégories UICN de risque d'extinction, mais aussi leur importance écologique (*e.g.* espèces fondatrices ; espèces clé de voûte) ou stratégique (espèce parapluie dont la conservation entraîne celle de toutes les autres de son écosystème). Enfin, maintes espèces peuvent être ciblées, si le coût des plans de conservation et leur chance de succès sont considérés dans les priorités de conservation (Joseph *et al.* 2009).

En France, même avec les arguments scientifiques les plus fondés, il s'avère bien plus facile de protéger les belles fleurs, comme les roses botaniques, les tulipes ou les narcisses, que de simples graminées. La canne de Fréjus en constitue une illustration flagrante. Elle souffre de son image erronée de « roseau commun », voire même de plante envahissante perçue par la population locale, en opposition complète avec la réalité scientifique : aire restreinte, très faible diversité génétique, histoire glorieuse et forte régression en 20 ans. L'image négative d'*A. donaciformis* rend sa conservation bien plus complexe que celle de taxons emblématiques et/ou ornementaux. Par sa marginalisation liée aux pratiques agricoles puis à l'urbanisation, cette espèce se retrouve sur des bords de terrains publics et privés en milieu urbain, à la merci des défrichages abusifs. Sa conservation passe obligatoirement par la sensibilisation des habitants de Fréjus, afin de réhabiliter l'espèce aux yeux du grand public.

Un second travers en biologie de la conservation réside dans l'écart constaté entre la théorie et la pratique ('**knowing-doing gap**' ou 'research-implementation gap' ; Knight *et al.* 2008). Ainsi, les résultats des recherches dans la discipline seraient pris en compte à 20% dans les politiques de conservation et à 37% dans la gestion d'espèces menacées (Fazey *et al.* 2005), et seulement 23% des responsables de plan de gestion ('compilers') consulteraient des articles scientifiques (Pullin *et al.* 2004). La littérature explique cet écart par : le manque

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

d'accessibilité et d'utilité de ces travaux, le temps trop long pour réaliser la bibliographie scientifique ('trouver, accéder et lire' les articles ; Pullin *et al.* 2004), le délai de publication en biologie de la conservation (en moyenne 18 mois après soumission; Kareiva *et al.* 2002 ; 4 ans après la fin de la récolte des données ; Fazey *et al.* 2005), l'absence de discipline intermédiaire entre théorie et pratique (*i.e.* 'evidence-based approach'; Pullin & Knight 2001), le manque d'articles de synthèse (6% des articles; Fazey *et al.* 2005) et l'absence d'indications pratiques concluant les travaux de recherche (Fazey *et al.* 2005).

La conservation de la canne de Fréjus illustre bien ce décalage entre les connaissances scientifiques sur l'espèce et les mesures pratiques pour sa conservation. En effet, malgré nos travaux sur l'écologie d'*A. donaciformis*, les sites de transplantation proposés jusqu'à présent par le service Environnement de la commune de Fréjus se situent en général dans des zones inondables totalement défavorables à l'espèce. Ces choix se justifient en réalité par le statut non-constructible de ces terrains, constituant les derniers îlots de végétation 'naturelle' dans le secteur occupé par l'espèce. Ainsi, toutes les connaissances accumulées sur l'espèce s'avèrent obsolètes si la conservation concrète d'*A. donaciformis in situ* n'est envisagée par les autorités municipales que dans les zones inondables. L'absence de prise en considération de la canne de Fréjus dans les plans d'aménagement urbain confirme ce triste constat. Espérons qu'avec les données établies lors de cette thèse et du programme PIRVE, et notre implication dans les transplantations expérimentales seront transposées de manière pratique sur le terrain et théorique dans le cadre de l'élaboration d'un plan de conservation « concerté ».

Enfin, une critique récurrente des travaux de conservation réside dans le manque d'**approche pluridisciplinaire** développant non seulement les connaissances intrinsèques à l'espèce (*i.e.* biologie, autécologie, génétique), mais aussi celles liées à son environnement (*i.e.* synécologie, géographie, sociologie ; Fazey *et al.* 2005 ; Campbell 2005). Cette nécessité d'ouverture se trouve justifiée par la diversité des menaces pesant sur la biodiversité et leur caractère anthropique. Ainsi, les sciences humaines peuvent jouer un rôle essentiel pour identifier, comprendre, puis limiter les impacts dus aux activités humaines, permettant l'établissement de mesures de conservation préventives. Cependant, les connaissances essentielles sur la biologie des espèces sont souvent considérées séparément du contexte environnemental et social, ce qui peut conduire à des incohérences importantes dans la pratique des mesures de conservation, et *a fortiori* en milieu urbain où l'activité anthropique constitue le forçage majeur structurant la biodiversité (Kattwinkel *et al.* 2011).

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus

L'approche pluridisciplinaire, si souvent souhaitée dans la littérature, a prouvé toute sa pertinence dans le cas présent. En effet, si les connaissances biologiques peuvent permettre une optimisation de sa conservation, cette dernière n'est possible qu'en analysant les menaces pesant sur l'espèce et sa perception par les acteurs locaux. Ces connaissances apparaissent très complémentaires et difficilement dissociables pour la mise en place d'un plan de conservation durable et concerté. Nous pouvons considérer que les enquêtes sociologiques ont fait l'état des lieux sur la perception de la canne de Pline à Fréjus par les différents acteurs et qu'un début de concertation a même été entamé lors de l'enquête avec un travail d'information et plusieurs échanges autour de l'espèce. Aujourd'hui, il s'agit donc de transmettre les conclusions aux différentes personnes interagissant avec la canne et de les rendre au final "acteurs" de la démarche. Nous allons donc mener une approche complémentaire de formation et d'information tournée vers deux publics. Un premier ensemble d'actions s'adressera aux services techniques et aux chefs de chantier, tandis qu'un second volet visera à sensibiliser la population (CF encart, prochaines actions de sensibilisation).

Annexes

IV. Conservation d'A. *donaciformis* à Fréjus

Espèce méditerranéenne menacée et aménagements urbains : le cas d'*Arundo plinii* Turra à Fréjus

B. Vila, C. Barthélémy, JN. Consales, L. Hardion, J. Lefèvre, B. Lizet, G. Renoux, R. Verlaque
En collaboration avec M. Goiffon, C. Lizée et C. Geneys

Introduction – Etudier les liens étroits d'une plante endémique rare avec les logiques urbaines passées et présentes

Les botanistes ne s'attardent pas sur la flore urbaine et anthropozoogène¹ constituée de taxons à large aire et d'indigénat douteux. En France, sur le millier d'espèces protégées au niveau national ou régional (Olivier *et al.* 1995), seulement deux espèces végétales sont inféodées au milieu urbain : la Gueule de loup, *Antirrhinum majus* L. subsp. *tortuosum* (Bosc) Ball, et la Canne de Pline *Arundo plinii* Turra. Or, les deux se rencontrent à Fréjus, ville littorale du Var, respectivement sur ou près des ruines romaines. En raison d'un contexte géologique unique «la dépression permienne de Fréjus», cette commune constitue un haut lieu pour la flore patrimoniale, abritant le tiers des taxons rares ou protégés du Var, dont une dizaine d'endémiques (Cruon *et al.* 2008). Sur ces 106 taxons, 59 ont déjà disparu de la commune et seulement 47 y subsistent, dont 27 en forte régression. Ils sont, ou étaient, à 80% inféodées aux zones humides et/ou littorales, se trouvant ainsi au centre d'enjeux de développement urbain et de conservation de la biodiversité.

La Canne de Pline constitue un cas d'école, puisqu'elle s'insère dans le tissu urbain, le réseau hydrographique et en arrière plage sur la communauté d'agglomération de Fréjus-Saint-Raphaël. Cette espèce, ayant perdu en 20 ans 60% de son territoire, ne subsiste que sur les terrains non encore bâtis : talus, friches, jardins, bords de cours d'eau... En France, les sites recensés sont essentiellement la région de Fréjus en PACA, et en Languedoc-Roussillon, deux stations disparues près de Narbonne et de Béziers (Olivier *et al.* 1995). Or, les travaux sur les problèmes de rareté (Verlaque *et al.* 1999, 2001, 2005) montrent qu'*A. plinii* cumule les handicaps menant à « la spirale fatale de l'extinction » (Olivieri & Vitalis 2001) : géophyte², non fructifère, aire restreinte et morcelée, lié aux zones humides et/ou littorales.

En croisant des disciplines issues des sciences de la vie et des sciences sociales, ce programme vise à sauvegarder une espèce menacée, et donc préserver la biodiversité urbaine, sans compromettre les aménagements d'une ville touristique comme Fréjus. Pour cela, nous avons étudié les liens étroits de cette plante rare, avec les logiques urbaines passées et présentes. Nous avons d'abord recherché les traces de cette canne dans un lointain passé : De quels usages a-t-elle fait l'objet ? Quelle importance ces usages revêtaient-ils dans la société locale ? Quelles espèces étaient concernées ? Puis, nous nous sommes interrogés sur le choix de Fréjus qui connut un grand développement urbain dans l'antiquité. Quels liens peut-on déceler entre les structures de la ville antique et moderne, et la répartition actuelle de la canne ? Peut-on lier la forte régression du taxon avec les dynamiques actuelles d'urbanisation ? Parallèlement, cette espèce protégée devant faire l'objet d'un plan de conservation, nous avons dû la reconsidérer à différents niveaux. Nous nous sommes penchés sur son statut, en raison de l'imbroglio taxonomique régnant dans le complexe *A. plinii s.l.*, puis sur son écologie, devant l'absence de

¹ Qui est produit par l'action de l'homme et des animaux.

² Plante vivace, possédant des organes lui permettant de passer la mauvaise saison enfouis dans le sol.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : Manuscrit F

données indispensables dans le cadre des transplantations/réimplantations préconisées par Fréjus. Enfin, nous nous sommes demandé comment cette espèce, qui a longtemps constitué une grande richesse, était perçue par les différents acteurs aujourd'hui. Ceci nous permet de définir quelques grandes lignes pour l'élaboration du plan de conservation et apporte des éléments analytiques quant au dépassement des contradictions entre Ville et Environnement.

Une histoire militaire et agricole

Des usages antiques

En 1765, Turra dédiait cette espèce à Pline l'Ancien qui avait vanté la qualité des plantes de Bologne (*locus classicus*) pour la confection multimillénaire des fûts de flèches. Pline écrit : « *L'Italie l'emporte sur les autres pays; aucun autre roseau n'est plus propre à faire des flèches que celui des bords du Rhénus; c'est celui qui a le plus de moelle, assez de légèreté pour fendre l'air, et assez de poids pour n'être pas emporté par le vent. Le roseau de Belgique (=Phragmites australis (Cav.) Trin.) n'a pas les mêmes avantages qui se trouvent aussi dans les meilleurs roseaux de Crète* » (= *Arundo micrantha* Lam.). Selon Pline, les anciens distinguaient les taxons par leurs usages ou leur provenance : « *il y a plusieurs espèces de roseaux : l'un est plus court, l'autre plus haut; l'un est plus mince, l'autre plus gros, un autre est creux, et bon pour faire des pipeaux. Le roseau à flèche forme une espèce particulière* ». Pline conclut : « *Le roseau décide les guerres de l'Orient ; Ethiopiens, Égyptiens, Arabes, Indiens, Scythes, Parthes...la moitié du monde vit sous un empire immense par les roseaux* ». L'observation des sculptures antiques (Figure 1 : colonne de Trajan) confirme ces citations explicites sur cet usage : flèches avec la marque des noeuds du chaume. De ce matériel périssable, il ne reste rien de l'époque, excepté de rares vestiges préservés dans les pyramides et les déserts d'Orient (Renoux 2006).

Dans l'histoire de l'humanité, l'arc constitue la première invention majeure (-35 000 ans), utilisé pour la chasse, puis pour la guerre en Mésopotamie, seules les armes à feu mirent fin à cette suprématie au XVI^{ème} siècle. En fait, les troupes d'archers caractérisaient les armées orientales, aux antipodes de la conception gréco-latine de la guerre au corps à corps, au glaive et à l'épée. Cependant, après la défaite de la première guerre Punique (3^{ème} siècle av. J-C.), les Romains engagèrent des auxiliaires dans leur armée, les fameux archers Crétois, et ainsi supplantèrent tous les peuples de Méditerranée occidentale. Notons que Carthaginois et Crétois disposaient d'une canne particulière, *Arundo micrantha*, probablement introduite d'Orient par les Phéniciens, là où il n'y avait pas de Canne de Pline. La découverte et l'occupation de sites où des cannes poussaient naturellement constituaient donc un avantage certain pour les armées en campagne. Il en résulte que l'installation des Romains à Fréjus a pu être en partie déterminée par la présence de ces plantes qui jouaient alors un rôle capital.

Lors des assauts, un bon archer (ils étaient des milliers) tirait 10 à 12 flèches/minute, d'où la remarque de Pline : « *avec ces armes les guerriers obscurcissent les rayons du soleil* ». On peut imaginer le nombre considérable de flèches nécessaires aux batailles. L'approvisionnement posait souvent de sérieux problèmes, car si la Canne de Pline abonde en Italie et en Grèce, elle est plus rare dans le reste du Bassin Méditerranéen. Dès lors, disposer de matière première à proximité s'avérait crucial et donnait un net avantage tactique. Pour les flèches, les cannes constituent un matériel très facile à utiliser, les chaumes étant très nombreux, rigides mais flexibles, légers, bien rectilignes et isodiamétrique, alors que le bois doit être retaillé et redressé. Cependant, le besoin impératif de munition pour les archers peut aussi jeter un doute sur l'indigénat de la canne à Fréjus : les Romains aurait pût la transplanter depuis l'Italie, comme le suggèrent certains archéologues (Renoux 2006).

D'autre part, une abondante littérature grecque (Théophraste) et romaine décrit les multiples utilisations des « roseaux » pour l'agriculture (coupe-vent, tuteurs, échelas), l'élevage (fourrage et abris), la musique (instruments à vent, anches), la construction (toits, plafonds : Vitruve), la pêche, la

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : Manuscrit F

vannerie, la médecine, comme combustible... «*En Italie, on emploie surtout le roseau à soutenir les vignes. Le prix du Calamus est de 11 deniers la livre* (Pline). *Avec la houe, faites des trous dans lesquels vous insérez les oeillets de roseaux à trois pieds les uns des autres* (Caton). *Cette plante vivace s'accommode de tous les terrains, elle préfère cependant un sol meuble et humide. On la propage au moyen de caïeux, de bouture, soit en couchant sa tige entière. On les coupe après le solstice d'hiver.* (Columelle). Or, la Canne de Pline n'est pas assez robuste pour satisfaire à ces usages qui concernent plutôt la Canne de Provence : *Arundo donax* L. Par contre, les méthodes de culture peuvent s'appliquer aux deux cannes, mais sûrement pas au vrai roseau (*Phragmites*).

Pourquoi Fréjus ?

D'abord occupée par les Celto-Ligures, Fréjus fut soumise par les Romains en - 155 et ils s'y établirent définitivement vers -124. A l'origine c'était un poste de ravitaillement stratégique pour les troupes, comme l'écrit l'historien C. Jullian (1920) «*Fréjus ouvrait et fermait la Gaule, épiait à l'Est et à l'Ouest* ». Toutefois, il faut attendre - 43 pour trouver dans la correspondance de Cicéron la première mention de *Forum Julii* (Marché de Jules). Ce nom fut donné par son fils adoptif Octave après la mort de Jules César qui avait voulu l'essor de Fréjus pour supplanter *Massalia* soutien son rival Pompée. D'après les archéologues, le port fut aménagé et creusé à cette période, à partir du rivage rocheux sous la butte Saint-Antoine, au coeur du centre-ville actuel (Bony *et al.*, 2011). Octave (dit Auguste) rapatria les galères prises à Marc-Antoine après la bataille d'Actium en - 31, et *Forum Julii* devint un puissant port militaire, le second après Ostie, ainsi qu'un grand marché artisanal et agricole. En - 22, Auguste en fit le chef-lieu de la Gaule Narbonnaise, puis sous Tibère, furent construits les grands équipements dont subsistent aujourd'hui les vestiges (amphithéâtre, aqueduc, thermes). Le territoire de la cité était considérable, l'agriculture développée autour des *villa rustica* à Villepey ou Saint-Raphaël, les exploitations minières et la pêche assuraient une économie florissante.

Forum Julii est aussi le seul site en Gaule et un des rares du Bassin Méditerranéen occidental où l'on trouve *A. plinii*, abondante en Italie et ressource indispensable pour l'armée. On peut alors se demander si cette Canne a été amenée et cultivée à Fréjus par les Romains, ou bien si étant déjà là, les Romains se seraient installés en partie pour sa présence ? Que la ville se soit développée en raison de l'existence de la canne, ou que la plante y ait été introduite et cultivée, il existe un lien étroit entre l'espèce et ses usages passés, se traduisant aujourd'hui par son imbrication dans les infrastructures urbaines de la ville de Fréjus.

Un présent urbanisé

Répartition actuelle et structure urbaine

A Fréjus, la canne de Pline est essentiellement localisée en centre urbain et péri-urbain. Les données de spatialisation (SIG) mettent en évidence trois points majeurs (Figure 2). Tout d'abord, la distribution du taxon est très fragmentée, mais la majorité des effectifs se répartit sur les berges non encore canalisées de deux cours d'eau (Pédégal et Valescure), et linéairement le long des structures urbaines et agricoles : bord de routes et ronds-points, haies et clôtures, limites de champs, talus de canaux. Deuxièmement, la canne est absente au sud de la ville, c'est-à-dire en deçà de la limite du rivage antique. En effet, aucune station ne se trouve au dessus de la lanterne d'Auguste, phare romain à l'entrée du port antique, aujourd'hui en ruine au coeur de la ville. Troisièmement, il existe plusieurs stations éparées liées à l'aménagement de structures modernes de la fin du XIX et du XX^{ème} siècles. On retrouve ainsi la Canne le long des talus de voies ferrées, routes et autoroutes, et sur des tas de terres consécutifs à divers travaux. L'analyse de la morphologie urbaine confirme ces observations.

Fréjus obéit à un modèle urbain quelque peu singulier. Son histoire urbaine a été fortement marquée par la période antique, comme en témoigne la présence de sites archéologiques bien au-delà de l'actuel centre-ville. Le tissu urbain récent paraît composite, intimement lié aux processus de littoralisation et d'héliotropisme. La centralité, marquée par un centre antique situé à 2 km du rivage

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : Manuscrit F

actuel, s'est vue étirée en direction de la mer à partir du XIX^{ème} siècle (attrait de la Côte d'Azur) pour former une extension littorale (comblement volontaire de l'ancien port romain et des marais devenus insalubres). Dans les années 1970, quelques cités d'habitat collectif ont été bâties notamment au Nord-Est du noyau historique. Toutefois, c'est certainement l'urbanisation de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle qui a le plus influencé le paysage urbain. Intimement liée au littoral et à l'économie résidentielle et touristique, celle-ci a mité le territoire communal d'une multitude de maisons individuelles, lotissements, résidences collectives, campings haut de gamme (bungalows), zones d'activités commerciales et touristiques.

Face à cette hétérogénéité du bâti, nous avons réalisé une classification de la morphologie urbaine :

1- Centre ancien : zone de centralité héritée de l'histoire antique, aux fonctions diverses (résidentielles, administratives, commerciales).

2- Extension littorale : zone de centralité héritée de l'histoire récente, liée au littoral avec les mêmes fonctions diversifiées (résidentielles, administratives, commerciales).

3- Zone d'habitat collectif, caractérisée par un bâti collectif (1950 à nos jours) et des fonctions essentiellement résidentielles.

4- Zone pavillonnaire : caractérisée par un bâti individuel et des fonctions surtout résidentielles

5- Zone d'activités : caractérisée par un bâti à vocation économique, commerciale, touristique, ludique ou de service (Figure 2).

Si nous considérons le seul critère urbanistique, la canne à Fréjus se trouve surtout corrélée au contexte pavillonnaire qui tient une place prépondérante dans le tissu urbain communal. Outre l'organisation le long du réseau hydrographique du bassin versant du Valescure, à une échelle plus fine, nous voyons que la D100 marque une limite importante à la progression de la canne vers le sud. En effet, le long de cet axe routier, la canne se trouve dans un entre-deux géographique (jusqu'alors organisé en plusieurs chenaux, le Valescure est alors canalisé en un seul chenal) et urbanistique (entre les zones d'habitat collectif et les extensions pavillonnaires proches du centre-ville). Comme souvent sur le littoral méditerranéen, c'est donc le puissant processus d'urbanisation, développé après la seconde guerre mondiale sur la commune, qui explique la physionomie urbaine de Fréjus.

Progressions et régressions : de l'usage des terres !

L'urbanisation récente a eu des effets importants sur la distribution de la canne à Fréjus. Réalisée à l'échelle fine du secteur situé entre La Pagode et l'hôpital municipal Saint-Lambert, l'étude diachronique comparant la répartition de la canne prouve sa très forte régression. Les surfaces occupées sont ainsi passées de 22,2 ha en 1991 à 12,2 ha en 2012, correspondant à une destruction de près de la moitié de sa superficie. L'analyse des photographies aériennes entre 1949 et 2008 montre l'importance des surfaces agricoles au XX^{ème} siècle et notamment celles des vignes (Figure 3). La plante semble avoir été repoussée aux marges du réseau parcellaire, servant parfois de délimitations aux champs. Nous pouvons faire l'hypothèse de la persistance de la canne à Fréjus sur les bords de champs, talus, canaux et berges des cours d'eau, c'est-à-dire des zones de moindre impact de l'activité agricole, qui ont constitué ainsi de véritables « refuges ». La déprise agricole a été pour la Canne une courte période de recolonisation des terrains agricoles abandonnés, avant l'urbanisation croissante des trois dernières décennies. En milieu urbain, le vallon du Valescure formé d'anciennes parcelles agricoles - inondables donc non construites - constitue un précieux témoignage de ce processus.

Mise en évidence d'une espèce endémique de Fréjus

De l'imbroglie taxonomique à la mise en évidence de la canne de Fréjus

La régression alarmante des surfaces occupées à Fréjus par *Arundo plinii*, consécutive à une urbanisation croissante a renforcé l'urgence de sa protection (Olivier *et al.* 1995). Or, la conservation de cette plante protégée en région Provence-Alpes-Côte-d'Azur était très difficile en absence de toutes connaissances scientifiques à son sujet. Longtemps considérée comme une seule et même espèce

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : Manuscrit F

circum-méditerranéenne, la canne de Pline (*Arundo plinii* Turra *sensu lato*) a ensuite été scindée en trois taxons, mal délimités et fluctuants (Danin 2002, 2004). Basés sur quelques caractères morphologiques, ces travaux préliminaires ont réduit *A. plinii* à une espèce à aire disjointe présente à Fréjus et à Bologne (N. Italie). Ces résultats très surprenants nécessitaient confirmation par la mise en œuvre d'études approfondies sur l'ensemble du complexe. Grâce à un large échantillonnage dans le Bassin Méditerranéen, nous avons réalisé des analyses morphométriques, génétiques et cytogénétiques. Ces nouvelles recherches ont confirmé l'existence de trois taxons, bien différents de ceux proposés par Danin : le circumméditerranéen *A. micrantha* Lam., l'Italo-Balkanique *A. plinii sensu stricto* et un endémique Ligure (Hardion *et al.* 2011, 2012). Majoritairement présent à Fréjus, ce dernier se distingue de son proche parent *A. plinii s.s.*, par son grand nombre chromosomique ($2n = 108$ vs. 76), sa robustesse, ses glumes (pièces florales) ciliées et ses caractères génétiques. Sur la base de ces critères très fiables, nous avons réhabilité et décrit une nouvelle espèce distincte, la canne de Fréjus, *Arundo donaciformis* (Loisel.) Hardion, Verlaque & Vila (Figure 4A).

Fréjus possédant 75% des effectifs de ce taxon endémique, il lui incombe de mettre en place une stratégie de conservation. Si nos recherches révèlent l'originalité spécifique des populations de la canne de Fréjus, la méthode fine d'empreintes génétiques (AFLP) souligne aussi l'absence de diversité génétique parmi 30 stations étudiées. Or, la diversité génétique est connue pour refléter l'adaptabilité de l'espèce en réponse à des changements environnementaux défavorables. Ce résultat soulève donc de nombreuses questions sur la stratégie de conservation à adopter, car il ne permet pas de désigner des stations à protéger en priorité.

Par ailleurs, nos recherches montrent l'existence d'une structuration biogéographique et morphologique des 3 taxons du complexe *A. plinii s.l.* en Méditerranée. Ceci nous permet de trancher les deux hypothèses de départ et d'affirmer que les Romains n'ont pas introduit *Arundo donaciformis* à Fréjus. En effet, trois raisons principales peuvent être invoquées : (1) cette endémique était déjà en Ligurie bien avant la fin du dernier maximum glaciaire (Hardion *et al.* 2013), (2) contrairement aux autres espèces du genre, l'Italo-Balkanique *A. plinii s.s.* se transplante très mal, et (3) aucune population en Italie ou ailleurs en Méditerranée ne présente les mêmes caractéristiques spécifiques. Par contre, la présence en abondance à Fréjus d'une canne morphologiquement très proche de celle d'Italie, mais plus robuste, aurait même pu constituer un argument déterminant dans le choix des Romains pour leur installation sur ce site stratégique.

Ecologie d'une « urbaine »

En opposition à son manque de variabilité génétique, l'étude écologique révèle la grande diversité des habitats occupés par *A. donaciformis*. Comme les autres espèces du genre *Arundo* en Méditerranée, la canne de Fréjus se rencontre surtout dans des milieux rudéraux ouverts, en marges des parcelles agricoles et des réseaux routiers, ferroviaires et hydriques. Cependant, elle croît aussi dans des habitats naturels, nettement contrastés à Fréjus : des dunes sableuses d'arrière plage, aux oueds à laurier rose, en passant par des formations forestières (*e.g.* pinède, ripisylve) (Figure 4B, C, D). Au sein de tous ces biotopes, la canne forme des peuplements monospécifiques dont la propagation clonale s'opère par l'extension de proche en proche des rhizomes. Même si l'espèce présente une affinité marquée pour les talus et berges des cours d'eau, il s'avère difficile de définir précisément son *preferendum*, la majorité des effectifs étant distribué dans un contexte urbain. Toutefois, grâce à la première transplantation réalisée par la ville³, une certitude écologique nous est acquise : elle n'est jamais présente dans les sols hydromorphes (ruisseaux et fossés : « les pieds dans l'eau »), où elle cède la place au vrai roseau cosmopolite et hydrophyte : *Phragmites australis* (Cav.) Trin.

Cette diversité d'habitats va de pair avec la large amplitude écologique de ce taxon, ainsi qu'à la grande persistance de ses rhizomes. Si les surfaces occupées par la canne sont en forte régression, paradoxalement cette canne a aussi profité de l'urbanisation pour se disperser, grâce aux transplantations accidentelles de rhizomes lors des travaux de terrassement. De ce fait, à Fréjus

³ La réhabilitation du quartier de La Gabelle situé en zone inondable s'est traduite par la calibration du cours d'eau pour laquelle Fréjus a obtenu une dérogation pour transplanter quelques cannes présentes.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : Manuscrit F

plusieurs stations seraient artificielles, résultant des déplacements de terres de remblais (Figure 4E). Face aux enjeux d'aménagements et de conservation, il s'avère donc nécessaire de poursuivre l'acquisition de connaissances sur la biologie de l'espèce, mais aussi de comprendre les perceptions et les appropriations diverses dont elle fait l'objet par les habitants et les aménageurs.

Une espèce végétale, entre méconnaissances et contradictions dans l'espace urbain

Les acteurs en charge de l'environnement au sein des communes de Fréjus et Saint-Raphaël se préoccupent de la canne de Pline de manière tout à fait récente. C'est à l'occasion de travaux de rénovation urbaine, en 2007, qu'une étude d'impact relative au Valescure a mis en évidence des stations de cannes dont le statut d'espèce protégée ne permettait pas la destruction. Aidé par la Direction Régionale de l'Environnement et de l'Aménagement (DREAL PACA), le service Environnement a élaboré un plan local de gestion, préconisant deux solutions inégalement réparties sur le territoire : la conservation *in situ* et le prélèvement puis la transplantation, générant de fait la destruction d'une grande partie des populations. Ces deux solutions permettent aux acteurs locaux d'adopter une forme de compromis, répondant d'une part aux exigences juridiques de la protection de la canne de Pline, et de l'autre, aux projets urbains en cours de réalisation. L'espèce végétale protégée représente une véritable contrainte dans un tissu urbain résidentiel, qui valorise le littoral et non le paysage agricole, qu'il contribue, dans le même temps, à faire disparaître (Cf analyse du PLU). Une enquête sociologique réalisée auprès de seize personnes, directement concernés par l'aménagement et la gestion de la canne de Fréjus, fait apparaître un élément explicatif supplémentaire quant aux préconisations des acteurs locaux (Barthélémy *et al.*, 2012). L'espèce Canne de Pline suscite des évocations ambivalentes, voire contradictoires. Elle est à la fois perçue comme vulnérable, unique et en danger, mais également comme résistante, pouvant assez facilement se répandre et donc, survivre à des transplantations. Des personnes la désignent même comme « envahissante », la comparant à du chiendent dont il s'agit de se débarrasser. Difficilement reconnaissable au sein des stations de canne de Provence, plus connue, elle serait régulièrement fauchée par les habitants et les services techniques de la ville. Ces représentations contrastées varient selon la position des acteurs interrogés dans le système social urbain organisé autour de la plante. La destruction reste légitime si l'espèce est considérée comme envahissante ; inversement, si l'idée de fragilité domine, la protection est attendue. Ce statut hybride explique, en partie, les résistances qui semblent freiner un changement de pratiques quant à la conservation de l'espèce. Il faut également souligner que la canne de Pline a fait l'objet d'une appropriation plus ancienne par des militants environnementalistes valorisant le statut endémique de l'espèce et sa conservation. Depuis les années 1980, des scientifiques reliés par des associations naturalistes alertent sur la disparition de la canne de Pline, ayant une écoute plus que limitée de la part des élus locaux.

C'est dans ce contexte de difficile d'appropriation politique par les acteurs locaux de la protection de la canne de Pline qu'une enquête ethnobotanique a été réalisée auprès des habitants (Lefebvre 2012). Celle-ci avait pour objectif d'approfondir la question des relations constituées autour de la Canne, dont l'identité est flottante, tant en ce qui concerne le nom qu'on lui donne que la valeur qu'on lui attribue. Seuls des agriculteurs utilisent encore un terme spécifique « canèu » pour distinguer cette « petite » canne, de la robuste Canne de Provence (*A. donax*). Pour la majorité des habitants, elle reste invisible, peu reconnue et très rarement nommée. Cependant, l'enquête révèle un système végétal plus étendu autour du « roseau ». Ainsi, de multiples usages, déjà relevés pour la période antique, ont résisté jusqu'aux années d'après-guerre. La mention « roseau de Fréjus » (associée à la Canne de Provence), soulignant une qualité supérieure du matériau, se retrouve dans maints écrits du XIX^{ème} siècle, jusqu'avant la seconde guerre mondiale. En effet, Fréjus fut longtemps le premier producteur au Monde de chaumes servant à la fabrication de divers instruments à vent et de anches. Pour concurrencer cette production très renommée, des rhizomes furent prélevés et cultivés sur tous les continents. Curieusement, ces transplantations se soldèrent par un échec, car les plantes obtenues ne purent jamais rivaliser avec les populations varoises (Perdue 1958), pire ce clone stérile (Ahmad *et al.* 2008) devint un « envahisseur ». Aujourd'hui, à Fréjus la fabrication d'anches et le développement de

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : Manuscrit F

certaines activités associatives maintiennent un lien résiduel avec l'utilisation des roseaux. Ainsi, les deux enquêtes en sociologie et en ethnobotanique ont permis de comprendre les liens existants entre les habitants et les acteurs de la ville et le système « Canne de Pline / Canne de Fréjus / Canne de Provence / roseaux ». L'étude approfondie des appellations, scientifiques et profanes, passées et actuelles, permet d'expliquer l'écart entre l'engouement scientifique pour l'espèce et la quasi-invisibilité de celle-ci auprès des habitants (Lefebvre *et al.*, 2013, sous presse).

La canne de Fréjus et ses enjeux

Conservation de la biodiversité et aménagements urbains

Au sein de la dynamique de construction intensive, de nos jours la canne de Fréjus se trouve repoussée sur les franges urbaines. Marginale, zonarde, la plante fait partie intégrante de la « Zonzo » fréjussienne, c'est-à-dire de « l'espace exclu, à l'abandon, à la marge, inexploré et portant vivant » (Careri 2013). De fait, à défaut d'être l'emblème biologique de la ville, elle est devenue caractéristique d'une urbanisation débridée récente ou à venir (Figure 4F). Dans ce contexte, rien d'étonnant de constater la rareté de la canne des documents publics de planification et d'urbanisme locaux. En effet, les pièces du Plan Local d'Urbanisme (PLU) de Fréjus la mentionnent seulement : trois fois dans le rapport de présentation (outil de diagnostic et non de projet), deux fois pour signaler positivement sa présence, une fois pour indiquer positivement son absence. Elle demeure absente du Projet d'Aménagement et de Développement Durable qui fixe les orientations de la commune, du cahier des Orientations d'Aménagement définissant les orientations d'urbanisme dans des secteurs à enjeux et des règlements de zonage. Cette absence de mention de la Canne de Pline dans les documents administratifs témoigne des représentations ambiguës des acteurs locaux (aménageurs, gestionnaires) à son égard – ambiguïté d'autant plus forte et préoccupante que les stations de canne sont classées dans le PLU dans des zones AU, c'est-à-dire à urbaniser. Peut-on alors opposer des projets d'urbanisme se faisant sans - ou contre - la canne de Pline, à des projets de paysage qui intègrent cette espèce protégée?

Vers un plan de conservation concerté ?

Son absence de variabilité génétique, sa résistance, sa persistance et sa culture facile devraient permettre une conservation aisée d'*A. donaciformis*. En fait, divers facteurs compliquent l'élaboration d'un plan de conservation. L'espèce est aujourd'hui quasi-exclusivement située dans un contexte urbain ou péri-urbain, subsistant dans les délaissés et zones en profondes mutations. S'il n'est pas toujours évident de réaliser un plan de conservation pour un taxon de milieu « naturel », cela devient très complexe lorsque l'espèce protégée n'est même pas intégrée aux schémas d'aménagements du territoire communal. A la différence d'espèces emblématiques, *A. donaciformis* n'évoque plus aucun lien avec ses usages antiques, ou même traditionnels assez récents. Pire, son statut de protection étant devenu un obstacle à l'aménagement, aujourd'hui sa présence est vécue comme une contrainte. Et ceci d'autant plus que la plante est repoussée dans les friches : lieux souvent insalubres et de non droits où les détritiques s'entassent et les rats prospèrent. Ainsi, les enquêtes révèlent une fracture où deux conceptions s'opposent : d'un côté une forte valeur scientifique, d'*Arundo plinii* vers l'espèce nouvelle *A. donaciformis*, et de l'autre l'état indifférencié de la plante dans la vision courante. Enfin, d'un point de vue biologique, l'espèce s'avère hors normes : endémique rare, clonale, urbaine... Loin d'être un exemple unique, *A. donaciformis* représente un cas d'école de la confrontation entre l'aménagement urbain et la conservation de la biodiversité. Les menaces d'extinction et les tensions entre les acteurs du développement local et de la protection nécessitent donc la mise en place d'un plan concerté de conservation.

Premières recommandations

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : Manuscrit F

S'il s'avère aujourd'hui inconcevable de détruire de nouvelles stations de canne, il n'est pas non plus possible de bloquer l'aménagement d'une ville touristique de la Côte-d'Azur. Compromis et consensus devraient donc être les maîtres mots pour la gestion future de la Canne de Fréjus.

Si la génétique n'a pas permis de distinguer des stations à conserver en priorité, l'étude souligne la diversité des biotopes occupés. Les deux plus grandes stations actuelles, Valescure et Pagode, doivent être conservées car représentatives de l'habitat principal de la canne : milieux ouverts de talus au bord des canaux. Elles abritent de nombreux taxons et plusieurs espèces protégées, et constituent une véritable trame « verte et bleue ». A ces localités, il faut ajouter celles qui offrent un habitat particulier : arrière plage (Villepey, Boucharel...), ripisylve (cimetière, Reyran, péage...), pelouses et friches... L'ensemble forme un réseau de stations et de milieux variés représentant une « assurance » pour la conservation.

Les compromis peuvent avoir lieu au sujet des stations « artificielles » (par exemple un promontoire de terre issu de travaux) sans avenir écologique et qui pourraient être utilisés pour renforcer des stations fortement endommagées.

Il convient maintenant de « stabiliser » juridiquement certains espaces occupés par la canne. Une première avancée, importante, a été réalisée avec la proposition de transformer certaines parcelles AU en non urbanisable, notamment au niveau de la zone du Valescure. Pourra-t-on aller jusqu'à la cessation de ces parcelles à un gestionnaire indépendant ?

D'un point de vue pratique de la gestion, il faut mettre en place un cahier des charges sur « l'entretien » des stations, en particulier vis-à-vis du fauchage (fréquence et saison appropriées) et tenir un registre des interventions afin de pouvoir réaliser un suivi sur le long terme...

Enfin, il faut patrimonialiser l'espèce en informant les gestionnaires de terrain, le grand public, les associations... : la canne de Fréjus est unique au monde.

Conclusion - La canne de Pline, ou plutôt la canne de Fréjus, sous un regard interdisciplinaire : quand la biodiversité urbaine nous parle de l'histoire entre les villes et leur environnement naturel

Le croisement des disciplines engagées dans ce programme aboutit à trois résultats majeurs.

La compréhension des interactions entre la ville et son environnement doit tout d'abord s'inscrire sur le long terme. Ainsi, l'approche historique révèle la grande importance économique jusqu'à un passé récent de la Canne de Pline *s.l.* La présence de cette canne, capitale dans l'antiquité, a certainement conduit les Romains à s'installer là où elle poussait. La mise en évidence des limites de l'ancien rivage à l'époque romaine a également permis de souligner la faible dynamique d'*A. donaciformis* qu'on ne retrouve toujours pas, deux millénaires plus tard, en deçà de cette zone.

Les sciences sociales et celles de l'environnement sont deux approches complémentaires et indispensables pour comprendre les interactions socio-naturelles de l'espèce afin d'élaborer un plan de conservation. Jusqu'à présent, les mesures de conservation reposaient presque exclusivement sur les études de l'environnement, tandis que les dimensions sociales et historiques étaient peu, voire jamais, prises en compte. De ce fait, la réussite de nombreux plans de gestion a souvent été compromise, conduisant même parfois à de véritables échecs. Seule la concertation avec les acteurs locaux permettrait de bâtir des plans rationnels et concertés de gestion qui seront à long terme les meilleurs garants de la réussite finale.

Enfin, le travail de terrain s'est révélé comme un véritable lieu de médiation. Propriétaires, habitants, promeneurs... questionnent les scientifiques, sociologues, écologues et ethnologues sur la « Canne de Pline ». Ces derniers expliquent les raisons de leur présence, leurs travaux, parfois interrogent à leur tour et partagent leurs résultats... Forts de ces récentes données, nos recherches donneront lieu en 2013-2014 à des actions de formation auprès des personnels techniques, et de sensibilisation auprès des habitants, dans le cadre d'un financement avec la DREAL PACA.

Sur le plan théorique, ce programme apporte plusieurs informations capitales sur les relations Ville-Environnement, au travers de la relation Homme-Canne.

Suivre la canne de Fréjus dans le temps et l'espace met en lumière un patrimoine végétal qui se rappelle, malgré l'urbanisation, à la ville et à ses habitants. En outre, l'histoire ancienne mêle

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : Manuscrit F

plusieurs espèces de cannes longtemps confondues. En effet, nos recherches sur leur origine révèlent des liens tout à fait surprenant entre leurs utilisations et les civilisations antiques. Pour les taxons autochtones utilisés pour la fabrication des fûts de flèches, l'endémique *A. donaciformis* marque le territoire de la civilisation Ligure, alors que l'endémique Italo-Balkanique *A. plinii s.s.* correspond à la civilisation Gréco-Romaine. Très particulière, la distribution d'*A. micrantha* complète celle d'*A. plinii* en Méditerranée, et presque toutes ses stations correspondent à des régions soumises à l'influence Phénicienne. L'introduction de ce taxon en Occident a donc dû se réaliser au début du premier millénaire av. JC., motivée par le même usage fondamental : les flèches. Ainsi, lors de leur conquête, les Romains s'installèrent en priorité dans ces zones où préexistaient les cannes (ceci explique notre erreur initiale sur les stations et villes romaines). Enfin, la dernière espèce *A. donax*, mal nommée Canne de Provence, présente l'aire d'un quelconque taxon méditerranéen. Indissociable des paysages et de la vie en Méditerranée, elle constitue un auxiliaire naturel de l'agriculture et de l'élevage, notamment dans les zones sèches (Gélard 2007). Son introduction depuis l'Orient remonte pourtant fort loin, après la révolution du Néolithique (sans doute avec la vigne).

Références

- Ahmad R., Liow P., Spencer D., Jasieniuk M. 2008. Molecular evidence for a single genetic clone of invasive *Arundo donax* in the United States. *Aquatic Botany* 88: 113-120.
- Barthelemy C., Lizee C., Geneys C. 2012. *La Canne de Pline à Fréjus, révélatrice des "lieux d'apprentissage" de la relation entre la nature et la ville*. Rapport de recherche, Programme PIRVE, C2PSY, LPED, 34 p.
- Bony G., Morhange C., Bruneton H., Carbonel P., Gébara C. 2011. 2000 ans de colmatage du port antique de Fréjus (*Forum Julii*), France : une double métamorphose littorale. *C. R. Geoscience* 343 : 701–715.
- Careri F. 2013. *Walkscapes, la marche comme pratique esthétique*. Edit. J. Chambon, Coll. Rayon Art.
- Caton l' Ancien (3e siècle av. J-C.). *De l'agriculture*. Paris, C.U.F., Les Belles Lettres, 1975. Texte établi et traduit par R. Goujart.
- Columelle (1er siècle ap. J-C.). *Les agronomes Latins (Columelle-Varron)*, sous la direction de M. Nisard, Paris, 1864.
- Cruon R. *et al.* 2008. *Le Var et sa Flore : les espèces rares ou protégées*. Naturalia édit.
- Danin A. 2004. *Arundo (Gramineae) in the Mediterranean reconsidered*. *Willdenowia* 34: 361-369.
- Danin A., Raus T., Scholz H. 2002. Contribution to the flora of Greece: a new species of *Arundo* (Poaceae). *Willdenowia* 32: 191-194.
- Gélard M-L. 2007. Le roseau protecteur : Techniques et symboliques d'une plante dans le Sud marocain. *Technique et Cultures* 48-49 : 61-84.
- Hardion L. 2010. *Espèce méditerranéenne menacée et aménagements urbains : le cas d'Arundo plinii à Fréjus*, Rapport de master 2 Recherche Biodiversité et Ecologie Continentale, Master Sciences de l'Environnement Terrestre, Institut Méditerranéen d'Ecologie et Paléoécologie.
- Hardion L., Verlaque R., Baumel A., Juin MA., Vila B. 2012. Revised systematic of Mediterranean *Arundo* (Poaceae) based on AFLP fingerprints and morphology. *Taxon* 61: 1217-1226.
- Hardion L., Verlaque R., Callmander M.W., Vila B. 2012. *Arundo micrantha* Lam. (Poaceae), the correct name for *A. mauritanica* Desf. and *A. mediterranea* Danin. *Candollea* 67: 131-135.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : Manuscrit F

- Hardion L., Verlaque R., Fridlender A., Vila B. 2011 - in Marhold K. (ed.), IAPT/IOPB Chromosome data. *Taxon* 60: 1221.
- Jullian C. 1920. *Histoire de la Gaule. Tome VI- La civilisation Gallo-Romaine*. Chap. V. En Narbonnaise. Hachette édit., Paris.
- Lefebvre J. 2012. Les roseaux et la canne de Pline, de l'indésirable à l'exceptionnelle : un terrain ethnobotanique à Fréjus. Mémoire de Master 2 Recherche, Master Environnement Développement Territoire et Sociétés, Muséum national d'histoire naturelle, 102p.
- Lefebvre J., Lizet, Barthélémy C., sous presse. « Conservation et pluridisciplinarité : quelle place pour l'ethnologie ? » La canne de Pline (*Arundo plinii* Turra), une plante protégée dans la ville (Fréjus, Var). *Ethnographiques.org*
- Olivier L., Galland J.P., Maurin H., Roux J.P. 1995. Livre rouge de la flore menacée de France. Espèces prioritaires. Coll. Patrimoine nat. vol. 20. MNHN, CBN Porquerolles, Ministère de l'Environnement, Paris.
- Olivieri I., Vitalis R. 2001. La biologie des extinctions. *Médecine Sciences* 17: 63-69.
- Perdue R.E. 1958. *Arundo donax*, source of musical reeds and industrial cellulose. *Econ. Bot.* 12: 368-404.
- Pline L'Ancien (1er siècle ap. J-C.). *Histoire Naturelle*, Livres XVI à XXI, Paris, C.U.F., Les Belles Lettres, 1981. Texte établi et traduit par J. André.
- Renoux G. 2006. Les archers de César. Recherches historiques, archéologiques et paléométallurgiques sur les archers et leur armement dans l'armée romaine du Ier s. av. J.-C. au Ier s. ap. J.-C. De César à Trajan. Thèse, Université de Toulouse Le Mirail.
- Théophraste (IV^e siècle av. J-C.). *Recherches sur les plantes*, Livres III-IV, Paris, C.U.F., Les Belles Lettres, 1989. Texte établi et traduit par S. Amigues.
- Turra A. 1765. *Farsetia, novul Genus. Venetiis*.
- Verlaque R. 1999. L'endémisme en Méditerranée : caractéristiques et menaces. *Biosystema* 17: 45-52.
- Verlaque R., Aboucaya A., Michaud H. 2005. Rarity and extinction in the Mediterranean flora of the South-eastern France. Inter. Symp. "Mediterranean plant Conservation in a changing world". Hyères.
- Verlaque R., Médail F., Aboucaya A. 2001. Valeur prédictive des types biologiques pour la conservation de la flore méditerranéenne. *C.R. Acad. Sc., Sc. Vie* 324: 1157-1165.
- Vitruve Pollion M (1^{er} siècle av. J-C.). De l'architecture, *Livre VII*. Paris, C.U.F., Les Belles Lettres, 1986. Texte établi et traduit par L. Callebat.



Figure 1. Colonne de Trajan érigée à Rome en l'honneur de l'armée. Ce bas relief illustre l'équipement des archers : arcs, flèches, carquois, boucliers et leurs diverses tenues.

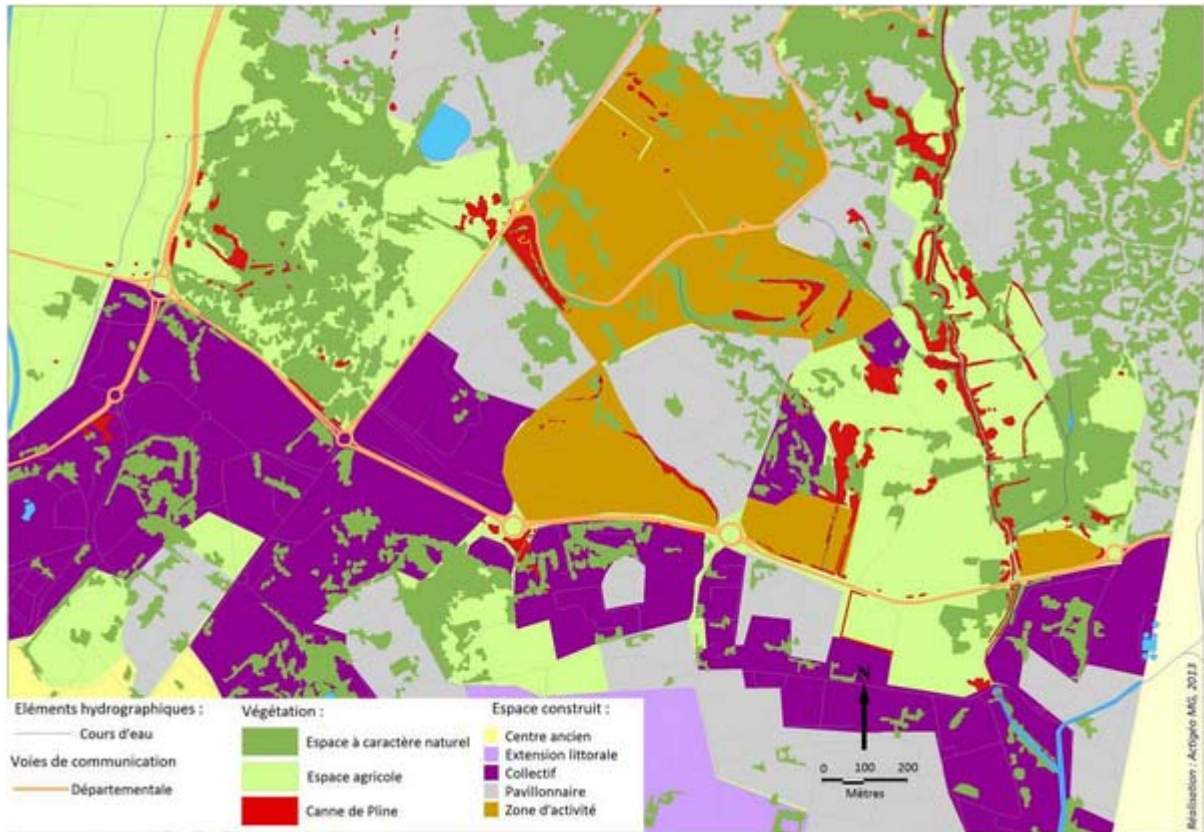


Figure 2. Classification de la morphologie urbaine et répartition actuelle de la « canne de Pline » dans le secteur à enjeu de conservation : le vallon du Valescure et la « Pagode ». Sources : IGN-BDTopo 2010, Communauté d'Agglomération de Fréjus-Saint-Raphaël 2008 ; IMBE 2012.



Figure 3. Photographies aériennes montrant l'occupation du sol en 1949 (A) et son évolution en 1987 (B) et 2008 (C) dans le secteur à enjeu de conservation : le vallon du Valescure et la « Pagode ».



Figure 4. Photos de la « Canne de Fréjus ». A : au niveau du rond point de l'Hôpital Saint-Lambert, entre bâtiment et route ; B : en lisière de bois ; C : en arrière plage de sable à Villepey ; D : talus du ruisseau du Valescure (vallon de Valescure), limite de champs colonisée par la canne après la déprise agricole ; E : repousses de canne dans les tas de terre issus des travaux de réhabilitation du quartier de la Gabelle ; F : ancienne parcelle agricole devenue friche, en lisière des terrains en construction.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

Manuscrit G

Title: Which future for an endemic weed on the French Riviera: Conservation of *Arundo donaciformis* (Loisel.) Hardion *et al.* (Poaceae) in urban environment

Running title: Conservation of *A. donaciformis* in urban environment

Authors: Laurent Hardion¹, Carole Barthélémy², Jean-Noël Consales³, Régine Verlaque¹, Bruno Vila¹

Address: ¹ Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, UMR CNRS IRD, Aix Marseille Université, 13331 Marseille, France

² Laboratoire Population Environnement Développement, UMR IRD, Aix Marseille Université, 13331 Marseille, France

³ Temps Espaces Langues Europe Méridionale Méditerranée, UMR CNRS, Aix Marseille Université, 13331 Marseille, France

Corresponding author: bruno.vila@imbe.fr

Keywords: protected species, urban planning, interdisciplinary approach, knowing-doing gap

Abstract:

Expansion of urban environments causes species extinction and biotic homogenization even in biodiversity hotspots. In Fréjus (French Riviera), the protected endemic *Arundo donaciformis* (Poaceae) stops planning projects. This confrontation between urban development and biodiversity was studied to draw a conciliated conservation plan through a multidisciplinary approach investigating species genetic structure, diachronic distribution, ecological niche, human perceptions and integration in the socio-urban system.

AFLPs markers showed the lack of genetic variation of *A. donaciformis*, whereas SIG evidenced an urban distribution fragmented in many linear patches located along hydrologic network, roads and field margins. Diachronic study clearly exhibited its half-regression due to massive urbanization. Despite its status of protection, *A. donaciformis* is absent of public planning documents. Soil and floristic analyses described a ruderal mesophile species. The sociological surveys highlighted two opposed speeches: the first evocating rarity, endemism and strong regression of this threatened species, the second evocating a highly resistant species, even an invasive weed of wastelands.

Today, 70.5% of the *A. donaciformis* area is located in the urban environment of Fréjus. Theoretically, its status of protection and its biological traits should optimize its conservation, but its low dynamism and genetic uniformity represent serious threats. This taxon has also become the symbol of urban disturbance and landscape disruption, an unattractive perception decreasing the awareness of local population and its implication in species conservation. Finally, a public mediation represents a decisive step for biodiversity conservation under this urban environment.

Journal intended: Biological conservation

1. Introduction

Towns and cities of the world have exceptionally increased for a century. They currently gather more than a half of global human population (UNFPA 2007). This localized demographic rise has led both to the expansion and the densification of urban environments. As a component of habitat destruction, this urbanization is a leading cause of species extinction (Brooks *et al.* 2002). Moreover, urbanization is also a major force of biotic homogenization (McKinney & Lockwood 1999). Human activities induce floristic substitutions of native species by synanthropic taxa adapted to urban conditions. If this massive replacement does not drastically reduce local species richness, it strongly impacts global biodiversity (McKinney 2006). Despite the distribution of urban areas, *i.e.* ~ 4% of terrestrial surface, limit these impacts, several hotspot regions are concerned by urbanization (Luck 2007). As urban population steadily increases, the consideration of indigenous nature into urban planning becomes a new challenge for biological conservation (Dearborn & Kark 2009).

The Mediterranean Basin represents an exacerbated case of cohabitation between biodiversity and civilizations since the Antiquity. The mild climatic conditions of this hotspot of biodiversity allows the persistence of 25 000 plant species (of which a half endemic; Quézel 1985; Myers *et al.* 2000), but also the establishment of about 0.5 billion people, and a half more during summer season (Cuttelod *et al.* 2009). As a regional hotspot of biodiversity welcoming 1.5% of worldwide tourism each year (Médail & Quézel 1997; Médail & Diadema 2006), the French Riviera largely illustrates the urban impact on native taxa. Located on the coastal foothills of Western Alps, this region played a crucial role of refugia for the persistence of local biodiversity during climatic pejourations of Pleistocene (Médail & Diadema 2009). This biogeographical legacy confers to this region an exceptional biodiversity, with 220 endemic plant taxa on only 30 000 km² (Médail & Verlaque 1997), and major responsibilities in species conservation. Unfortunately, Maritime Alps also suffer of a deep impact caused by human activities since the Neolithic, and a densification of urban environment for a century (Blondel 2006). This massive urbanization has led to the reduction of non-built seashore to 8% and the extinction of numerous taxa (Médail & Diadema 2006). In order to prioritize conservation strategies, statistical studies in this region revealed that lowland and coastal geo-, thermo- and hydrophytes are the most threatened plant taxa (Médail & Verlaque 1997; Verlaque *et al.* 2001).

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

Among these highly threatened plant species, *Arundo donaciformis* (Loisel.) Hardion *et al.* (Poaceae) represents an exceptional case of endemic taxon persisting in urban environments of the French Riviera. Distributed from French to Italian Liguria, this rare species mainly occurs in the urban network of Fréjus (Var, France; fig. 1). Under its protected status, *A. donaciformis* currently stops several planning projects of this seaside resort town (Olivier *et al.* 1995). In addition, this rhizomatous grass forms dense patches of rigid culms (up to 3 m tall) often designed as fire risks, mosquito habitats or just as esthetic inconveniences. Long-time neglected before urbanization, it currently becomes an unwelcome taxon limiting human well-being. On the other hand, conservation stakeholders testify about its decreasing distribution over the last twenty years, calling for scientific investigations to improve its protection (Lavagne 1991; Danton & Baffray 1995). Indeed, *A. donaciformis* has been described as a clonal and non-fructiferous species (Hardion *et al.* 2012), but the lack of knowledge on its distribution, genetic diversity and ecology limits its conservation.

Such an exacerbated confrontation between urban growth and biodiversity must be investigated with a multidisciplinary approach mixing biological, geographical and social aspects of species conservation (Grimm *et al.* 2008). Although this objective fits into new challenges in biological conservation, so-called multidisciplinary approaches are still infrequent in the literature (Fazey *et al.* 2004; Campbell 2005). However, this urban context makes species conservation possible only with the awareness of local population and authorities as crucial stakeholders. In view of the endangered situation of *A. donaciformis*, conservation priorities are to take an exhaustive inventory of species distribution including information on genetic structure, ecological niche and potential threats, but also to better understand the human perception and urban position of this cast-off endemic grass through space and time. Based on this exhaustive inventory, the main aims of this study are (i) to define conservation priorities using the genetic diversity of *A. donaciformis* as an indicator of adaptive potential; (ii) to point out its autecology in order to optimize future transplantations, (iii) to study past and present distributions in parallel with urban evolution, (iv) to reveal the integration degree of this protected species in current urban planning, but also its human perception by conservation stakeholders questioned during sociological surveys. Finally, every compartments of this multidisciplinary approach were gathered to draw the first lines of a conservation plan for *A. donaciformis* in Fréjus.

2. Material and methods

2.1. Plant material, DNA extraction and AFLP fingerprints

In order to avoid oversampling of same clonal genotypes, a first set of 30 samples were collected among the species distribution (Fig. 1). These localities were chosen according to their threatened position in urban planning (source: F. Walicki, E. Schmaltz and J.M. Prieur, agglomerations community of Fréjus-Saint-Raphaël) or to their marginal geographic positions (Fig. 1). Thus, 26 populations were sampled in Fréjus and surrounding localities, of which 10 currently stop projects of urban planning. The four localities known far from Fréjus were also added to the sampling: Lespignan (Languedoc-Roussillon, France), Cervo, Andorra and Finale Ligure (Liguria, Italy). For each sample, 50 mg of silicate-dried limb were ground using liquid nitrogen and ballpoint grinder (Tissue Lyser QIAGEN). The protocol of DNA extractions followed Doyle and Doyle (1987) with modifications: 1.4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8 and 4% CTAB, precipitation with 95% ethanol, washing of centrifuged pellets in 70% ethanol, drying and suspension in TE-buffer with RNase. All DNA concentrations were diluted to 50 ng/μL using a Biophotometer (Eppendorf, Germany).

AFLPs method followed Vos *et al.* (1995) modified as indicated in Hardion *et al.* (2012), and using four primer pairs for selective PCRs: EcoRI+AAC/MseI+CAA; EcoRI+ACG/MseI+CAC; EcoRI+AAGG/MseI+CCAG; EcoRI+AACG/MseI+CAAG, dyed with 6-FAM fluorescence at 5' end (Eurofins MWG Operon). PCR products were separated and quantified on a MegaBACE automated sequencer (96-capillary Sequencer model 1000, Amersham Biosciences, USA). AFLP fingerprints were generated from electrophoretogram alignments using MegaBACE Genetic Profiler v.1.2 (Amersham Biosciences). Putative loci were defined as any fragment with minimum amplitude of 200 Relative Fluorescent Units (RFU) occurring in at least one electrophoretogram. Marker presences or absences were scored for each sample from 50 to 500 bp, discarding all overlapping peaks. The reliability of AFLP markers was evaluated with ten randomly chosen samples reanalyzed from preamplification to electrophoretogram scoring for each primers pairs. Nei-Li diversity and Nei genetic distances were obtained using AFLPdat R-package (Ehrich 2006; R Development Core Team 2013), which also includes a Clones-function selecting reliable multi-locus lineages and discarding genotypes generated by somatic mutations or genotyping errors (De Witte *et al.* 2011). In this goal, the largest pairwise genetic distance among the ten control samples was defined as a consistent threshold.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

2.2. Present and past distribution

Every patches of *A. donaciformis* already known (sources: F. Walicki, E. Schmaltz and J.M. Prieur, agglomerations community of Fréjus-Saint-Raphaël; Conservatoire Botanique National Méditerranéen, <http://flore.silene.eu>) or discovered during this study were accurately delimited and geo-referenced using a GPSMAP 60CSx (Garmin Europe, Southampton, UK). These data were then compiled using MapInfo v. 7.8 (Pitney Bowes Software Inc., USA) to build an exhaustive geographic information system of the species distribution. The percentage of human-disturbed surface was estimated for each patch using five classes (0-5, 5-25, 25-50, 50-75 or 75-100% of disturbed surface). We also recorded the nature of disturbance and potential evidence of transplantation for all patches. To complete this approach, a diachronic comparison of species distribution in Fréjus was undertaken using maps of species distribution realized two decades before (Lavagne 1991). Past distribution was manually computerized based map scans in MapInfo. As the distribution density of *A. donaciformis* is geographically variable, the diachronic analysis was lead in a study focus of 1.6 km², including a major part of species distribution.

2.3. Land use and urban planning

The influence of rural and urban context on species distribution through time and space were described by photo-interpretation. Five aerial photographs taken along the 20th century were extracted from Geoportail database (1:50.000 scale; www.geoportail.gouv.fr, IGN, France), including years 1926, 1949, 1971, 1991 and 2010 (ID 3544-0231, 3544-0291, 3544-0041, 91SAA1751, P10000222, respectively). Among the study focus, five categories of land recovers were manually delimited and estimated using MapInfo, including roads (linear motif), farmlands (regular motif, *e.g.* uniform, striped or polka-dotted ground surface), woods (>500m² surfaces including >50% of dark cloudy motif), wastelands (irregular motif, *e.g.* few randomly distributed trees with variable sizes, irregular patches of grassland), urban area (regular motif, *e.g.* buildings, artificialized surfaces). Moreover, we list the integration of *A. donaciformis* in Fréjus urban planning to identify local policies for this protected species and potential issues for its theoretical conservation. In this goal, urban planning documents (*i.e.* Local Development Plan, focusing on the Guidelines for Development and planning operations; www.ville-frejus.fr/emploi-logement/urbanisme/documents-opposables-3/) were screened to evidence the number of citations of *A. donaciformis*, but also its perception and position under planning contexts.

2.4. Ecological niche

In order to delimit the ecological niche of this non-fructiferous geophyte, soil samples collected in species rhizosphere (*i.e.* 10-30 cm depth) were analyzed for the 50 largest patches of *A. donaciformis* (Fig. 1). For each one, about 500 g of soil was collected under the first 10 cm horizon, *i.e.* in species rhizosphera. A total of 14 quantitative variables were measured (INRA, Arras, France), including the granulometric analysis (5 variables, NF X 31-107), contents of organic matter, carbon, nitrogen and calcium carbonate in dried soil, and water in fresh soil (ISO 10694, 13878 and 10693), pH (ISO 10390), cation-exchange capacity (ISO 23470) and conductivity. In addition, 14 qualitative environmental variables were described during the species inventory, providing approximate but exhaustive description of *A. donaciformis* autecology among its whole distribution. These qualitative descriptors mainly described soil properties, including grain size proportions, texture, form and structure of rough elements, color, density, porosity, pH, contents of CaCO₃ and organic matter, but also topography, luminosity and vegetation cover (Supplementary data 1, appendix A). Using convenient methods of agronomy and forestry (Brady & Weil 2011), these descriptors would accelerate *in situ* conservation processes during the identification of favorable sites for species transplantation (Lauber *et al.* 2011). In the same reasoning, floristic affinities of *A. donaciformis* were estimated with 30 vegetation surveys during springs 2012-2013. Studied patches were chosen according to their superficies, but also according to their inclusion within protected sites of natural interest (*e.g.* ZNIEFF, Natura 2000). We also described the receiver site of Castelas, the only official transplantation lead by the environment service of Fréjus in 2009, and where *A. donaciformis* persists despite a mitigate success. All vascular plant species were recorded in a quadrat of 100m² and quoted according to their recover (1-5), as classically done in phytosociology (Maarel 2007). These data were compiled and analyzed with a correspondence analysis using ade4 package in R v.2.15 (Thioulouse *et al.* 1997).

2.5. Sociological surveys

To study existing relationships between the plant species and stakeholders of its conservation, a sociological survey was conducted toward different actors contributing to its management. In this goal, 16 people were interviewed according to the standard model of semi-structured interviews. A content analysis was conducted on speech recorded and fully transcribed. These interviews allow us to understand how people perceive the species, how they directly act on, and what are the main strengths and brakes for its preservation.

3. Results

3.1. Genetic uniformity

The selection of reliable AFLPs markers generated by the four selective primer combinations gathered 144 fragments, of which 4.2% were polymorph. The clonal threshold designating reliably divergent multi-locus lineages was assessed to 2.1%, well fitting with admitted values for this method (Bonin *et al.* 2004). Set-up with this threshold, Clones-function failed to design more than one multi-locus lineage over the 30 samples analyzed. The Nei gene diversity was estimated to 0.006, reinforcing the lack of genetic variation among the 30 samples of *A. donaciformis*.

3.2. Present and past distribution

The total area covered by *A. donaciformis* among its whole distribution was estimated to 169 475m² among French and Italian Liguria. However, 70.5% of this total surface occurs in the agglomeration community of Fréjus-Saint Raphael (119 420m²), and 41.4% concentrated in the study focus (70 188m², fig. 2). Located in an urban environment, this central distribution is largely fragmented in numerous linear patches mainly distributed along hydrologic network as the Valescure river, but also along roads and field margins. Out of the study focus, *A. donaciformis* is less frequent but also highly correlated with human artificial structures (Fig. 2A). Indeed, these distant patches represent most of the 19 patches identified with certainty as transplanted (*e.g.* presence of concrete under rhizosphere; species occurrence limited to embankments). Nevertheless, *A. donaciformis* was absent from the southern urban zone which correspond to offshore lands delimited by the antic coastline (Fig. 1). Among the whole species distribution (*i.e.* 314 patches), only 20% of patches are free of direct human perturbations. Mowing and trampling represent the main perturbation suffered by *A. donaciformis*, and they impacted more than 75% of species biomass for a quarter of patches. The diachronic perception clearly demonstrated a strong regression of *A. donaciformis* in the study focus, with 166 840 m² (10.7% of the study focus) in 1991 to 70 188 m² (4.5%) in 2012, *i.e.* a loss of nearly half of its central distribution in two decades (Fig. 3; tab. 1).

3.4. Land use and urban planning

Aerial photographic of 1926 and 1949 clearly evidence the dominance of farmland in the central distribution of *A. donaciformis*, covering respectively 70.4 and 69.3% of the study focus (Fig. 4A, tab. 1), few wastelands (17.1 and 13.3% respectively) and only traces of

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

urbanization (3.7 and 7.2% respectively). According to our following results on species ecology, these few proportions of wasteland suggest a limited potential distribution of *A. donaciformis* to parcel margins and riverbanks. Important landscape modifications were seen from 1971 with the progressive abandonment of farmlands (52.7%) increasing wasteland cover, and the start of urbanization (16.1%; tab. 1). These decline of agriculture caused the drastic reduction of farmlands in 1991 (11.7%), leading to land abandonment (47.2%) or replacement by urban area (25.7%; fig. 4B). Finally, massive urbanization of the last years has induced a substitution of wastelands (26.6%) by urban area (48.0%; fig. 4C). Wood superficies has remained relatively constant through the 20th century (6.9, 7.8, 8.0, 10.7, 9.8% chronologically).

A. donaciformis is almost absent from public planning documents and local planning. The parts that make up the “Local Development Plan” of Fréjus mention it only three times. The species is only referred in the report of presentation (diagnostic tool and not project): two times to indicate its presence positively, one time to report positively its absence. It remains absent from the 'Projet d'Aménagement et de Développement Durable' (PADD) which sets the guidelines for planning the town, specifications Guidelines for Development which sets out planning guidance in areas of issues and zoning regulations.

3.4. Ecological niche

The exhaustive description of the 314 inventoried patches demonstrates that most of them are located in lowland open area (89.5% in herbaceous vegetation, 70.9% in full light conditions), without exposition preference (Supplementary data 1, appendix A). Even if numerous patches are located along watercourses (Fig. 2), 54.3% of patches are not connected with a visible hydraulic system. Based on quantitative analysis of the 50 largest patches, grain size means described relatively balanced soils, mainly sandy-loam (*sensu* USDA classification), *i.e.* with draining properties (Table 2). Combined with C/N ratios and cation exchange capacities, contents of organic matter indicate relatively fertile soils. They also possess relatively high contents of CaCO₃ inducing high pH values and potentially reflecting the occupation of absorbent complex by Ca²⁺ cations to the detriment of other bases. On average, water weight represents only 8.5 % of fresh sol (SD = 4.3). However, these average values must be pondered by the high standard deviation for most of these variables indicating a large variety of physicochemical conditions supported by *A. donaciformis* (Table 2). Qualitative description of the exhaustive species distribution corroborates these results,

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

describing lumpy, organic and weakly compact soils with equilibrated texture (Supplementary data 1, appendix A). Thus, more than half of patches (52.1%) possess few compacted soil, 80.5% of them have lumpy structure, and 59.1% of them present a balanced texture (including sandy-loam). The correspondence analysis of the 30 floristic inventories among *A. donaciformis* distribution mainly described a ruderal mesophile flora (Supplementary data 2, appendix A), with 26 patches partially sharing *Galium apparine* (n=15), *Bromus diandrus* (n=12), *Geranium robertianum* (n=12), *Vicia sativa* (n=12), *Vicia bithynica* (n=12), *Lathyrus clymenum* (n=11), *Avena sterilis* (n=10). However, we also observed two other strongly differentiated floristic associations, one situated in bush-type characterized by *Cistus* species (n=3), and another situated in a temporarily flooded wetland characterized by *Juncus* and *Cyperus* species (n=1). However, this last floristic association was observed only in the receiver site of the Castelas, where the species was transplanted five years ago.

3.5. Human perceptions

The sociological survey conducted on 16 stakeholders working around the conservation of *A. donaciformis* highlights two distinct speeches. On the one side, the plant evokes rarity, endemism and vulnerability. It is associated with the idea of endangered species whose populations have significantly regressed: « It is an endemic taxon, *i.e.* that occurs only in France [...] then, which have some resistance if nobody destroys it. So maybe it possesses its own potential. As I use to say, a species can possess all genetics or genetic diversity, nobody resist in front of a bulldozer » (Woman, research laboratory). This conservative perception concerned persons from institutions of flora protection, governmental representative of environment department and association for nature protection.

On the other side, the plant is seen as a highly persistent species, as a wastelands marker, or even as an invasive weed. Some stakeholders interviewed compare this cane to an invasive and undesirable plant taxon with high dispersal ability. It evokes the strength and ability of the species to maintain despite the urbanization: « It grow everywhere » (Man, environment service); « It's highly, highly resistant » (Man, public green service); « I personally think that is a species which is solid enough » (Man, association for nature protection); « And for a lot of people which possess large patch near to their home as protected public green, that's the place for dismantled mopeds go, where rats proliferate, where mouses proliferate... To the eye, it is that... that's crap. » (Man, association for nature protection); « That's a weed which bothers people that clean roadsides. That is the species

which re-invade asphalted car park, which pierces the tarmac. » (Man, association for nature protection) ; « We have seen it for 60 years. So, it has always grown back. Some summers it was completely dried, it seemed to be dead, it was shrivelled and all that. We said we got it, this time it would die. It grow back, f***... Nothing, since it rains again... » (Man, farmer).

This negative vision is supported by persons operating in urban planning, maintenance of public green, but also from naturalist association.

4. Discussion

4.1. *An endangered species*

Using an integrative approach of species conservation, this study described the highly threatened status of *A. donaciformis* under the urban environment of the French Riviera. This Ligurian endemic species currently possesses most of its distribution (70.5%, *i.e.* 119 420m²) fragmented in the urban zone of Fréjus. In the center of its distribution, *A. donaciformis* has lost 96 652 m² of its surface for twenty years. This regression is clearly explained by the accelerated urbanization in the same study focus, reach from 25.7% to 48.0% in same period. According to its ruderal ecology, this species should be promoted by the dominance of wasteland cover (47.2%) two decades ago. Moreover, its genetic uniformity among its whole distribution represents a new challenge for the establishment of conservation strategies. Indeed, no genotype and patch must be uppermost protected based on their adaptive potential. This lack of genetic diversity is often considered as a serious threat of inbreeding depression leading to species extinction (Reed & Frankham 2003). In addition to the lack of caryopsis production (Hardion *et al.* 2012), this genetic poverty makes *A. donaciformis* a highly vulnerable species only using clonal propagation to disperse itself. Moreover, this rhizomatous species seems to possess a low dynamic of dispersion, as shown by its absence on offshore lands southward the limit of antic coastline (Fig. 1).

4.2. *A theoretically easy conservation*

Despite these urban and genetic threats, *A. donaciformis* possess numerous advantages to maximize its conservation. First of all, the genetic uniformity of *A. donaciformis* represents both an adaptive handicap and a practical advantage simplifying transplantation procedures. Moreover, the lack of inter-individual genetic diversity is balanced by a high polyploid level ($2n = 18X = 108$; Hardion *et al.* 2011), potentially inducing high level of heterozygosity for this single genotype (Hegarty & Hiscock 2007). This species possess a large ecological niche,

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

as testified by broad standard deviations for soil variables (Table 2) and highly contrasted floristic affinities. Moreover, unwitting transplantation far from Fréjus (on rubble and soil embankments) suggest an important success rate for transplantation. This vegetative ability is also testified by the current persistence of *A. donaciformis* in the receiver site of Castelas despite the non-suitable environmental conditions of this temporary flooded basin. Paradoxically, urban planning is currently the most perturbation force in the central distribution of *A. donaciformis*, but also the main dispersal vector out of this zone. Adding to its large ecological niche, this vegetative dispersal ability makes *A. donaciformis* a suitable biological model to optimize its conservation under urban environment. The ecological preferendum of *A. donaciformis* for open ruderal lands can be projected in the evolution of land use during the last century. Mainly represented by wastelands, its habitat was rare in the rural landscape of Fréjus during the first half of 20th century (from 17.1 to 19.4%; fig. 4). Throughout this period, *A. donaciformis* was most probably relegated to field and river margins. Following the decline of agriculture, this marginal weed experienced a short period of expansion on the increased wastelands, as still visible around the Valescure. This important recolonization of abandoned farmlands in 1991 attests to its high resilience to several centuries of perturbation and marginalization under this agricultural landscape.

4.3. A difficult conservation in practice

Theoretically, the highly threatened status of *A. donaciformis* and its practical biological traits should optimize its conservation despite increasing urbanization (Naidoo *et al.* 2006). However, this species suffer of its ambivalent perception of both an endangered endemic grass according to regional stakeholders vs. an invasive weed according to local population. This shift of perception between stakeholders leads to a classic conflict between protectionism vs. interventionism making harder every concerted procedures of conservation. This negative perception is reinforced by its current restriction to urban fringe, roadsides and wasteland. This marginal weed is a part of the 'zozzo' of Fréjus, *i.e.* abandoned or discredited space within city (Careri 2013). Consequently, this protected species has become the symbol of urban disturbance and landscape disruption. This unattractive perception decreases the awareness of local population and its implication in species conservation. Nevertheless, this public mediation represents a decisive step for biodiversity conservation under urban environment (Bickford *et al.* 2012). Moreover, local discredit for this protected species was also illustrated by its few consideration in urban planning documents as an obstacle for

urbanisation. In the same time, the accelerate urbanization reduces land availability to unconstructible area, *i.e.* mainly temporary flooded zones non-suitable for *A. donaciformis*.

5. Conclusion – Toward a conservation plan

The mitigate success of the first official transplantation authorized by regional environmental authorities (DREAL PACA) lead to a better dialogue between regional scientists (present authors) and local urban operator (Environment service of Fréjus-Saint Raphaël). Based on ecological niche designed here, our concerted discussions lead to the designation of more suitable receiver sites for two future transplantations. The inventory of species distribution has also allowed to limit patches destruction. Nevertheless, *A. donaciformis* is still perturbed by mowing and trampling caused by local population and public green operators. Currently, the real challenge for species conservation resides in population awareness. In particular, public communication must act on human perception to highlight every positive impact of this native and endemic biodiversity in Fréjus. This knowledge diffusion must be initiated by scientists (with vulgarisation) and municipal service (with large diffusion) through the constitution of the conservation plan, and then relegated by local stakeholders (*e.g.* environment associations, green operators).

First of all, this robust grass currently forms the main structuring species of greens and riverbanks of Fréjus, linking peripheral areas under protection for their nature interest (*e.g.* ZNIEFF, Natura 2000) to urban greens located in the centre of species distribution. Thus, the conservation plan of *A. donaciformis* could single-handedly represents blue and green corridors to protect for limitation of nature fragmentation and maintenance of ecosystem services among Fréjus (Bolund & Hunhammar 1999). Moreover, this species can be highly valuable against riverbank stabilisation in the context of recent deadly flooding in Fréjus. Due to its patch density, its occurrence in riverbanks also limits the proliferation of invasive species in these sensitive environments (Verlaque *et al.* 2002). Finally, Mediterranean *Arundo* are synanthropic species which was highly useful during antic period (*e.g.* arrow weaponry, agriculture) and specifically in the antic roman port of Fréjus (*i.e.* *Forum Julii*). Distributed between the numerous archaeological sites of the town, this species also link the natural and human legacy of Fréjus.

In conclusion, this study shows the relevance of pluridisciplinary approach for species conservation among urban environment. Even with a suitable biological model, we show that biological conservation was not the only key for urban persistence. Indeed, the sociological

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

survey and the understanding of species distribution in a changing landscape will take a crucial place in the conservation plan. Finally, the study questioned about the place of non-attractive but native biodiversity in increasing urban environment.

Author contributions

L.H. and B.V. design pluridisciplinary approach and wrote the paper, L.H., R.V. and B.V. performed molecular and ecological analyses, C.B. analysed sociological surveys, J.N.C. studied the evolution of urban and species distributions.

Acknowledgements

Authors would like to thank everyone who participated in data collection in the field and *in silico*, including F. Druez, K. Lhoyer, J. Lefèvre, C. Lizée, C. Geneys, M. Goiffon and Pr. A. Lavagne, but also F. Walicki, E. Schmaltz, J.M. Prieur and F. Ferrero from the environment service of the agglomerations community of Fréjus-Saint Raphaël, and H. Michaud and V. Noble from the Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles. This study is supported by the Programme Interdisciplinaire de Recherche Ville-Environnement financed by the CNRS, the Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, du Transport et du Logement, and the Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Provence-Alpes-Côte d'Azur. The authors are also grateful for other financial support provided by the Fédération de Recherche ECCOREV and the Société Botanique de France.

References

- Bickford, D., Posa, M.R.C., Qie, L., Campos-Arceiz, A., Kudavidanage, E.P., 2012. Science communication for biodiversity conservation. *Biol. Conserv.* 151, 74–76.
- Blondel, J., 2006. The “design” of Mediterranean landscapes: a millennial story of humans and ecological systems during the Historic Period. *Hum. Ecol.* 34, 713–729.
- Bolund, P., Hunhammar, S., 1999. Ecosystem services in urban areas. *Ecol. Econ.* 29, 293–301.
- Bonin, A., Bellemain, E., Bronken Eidesen, P., Pompanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol. Ecol.* 13, 3261–3273.
- Brady, N.C., Weil, R.R., 2008. *Elements of the nature and properties of soils*, 14th ed. Upper Saddle River, Pearson Educational.
- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B., Rylands, A.B., Konstant, W.R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G., Hilton-Taylor, C., 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conserv. Biol.* 16, 909–923.
- Bruce Lauber, T., Stedman, R.C., Decker, D.J., Knuth, B.A., n.d. *Linking Knowledge to Action in Collaborative Conservation*. *Conserv. Biol.* 25, 1186–1194.
- Campbell, L.M., 2005. Overcoming Obstacles to Interdisciplinary Research. *Conserv. Biol.* 19, 574–577.
- Careri, F., 2013. Transurbance. In: Mariani, M., Barron, P. (Eds.), *Terrain vague: interstices at the edge of the pale*. London, Routledge, pp. 107–113.
- Cuttelod, A., García, N., Malak, D.A., Temple, H.J., Katariya, V., 2009. The Mediterranean: a biodiversity hotspot under threat. In: Vié, J.C., Hilton-Taylor, C., Stuart, S.N. (Eds.), *wildlife in a changing world: an analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species*, Gland, IUCN, pp. 89–101.
- Danton, P., Baffray, M., 1995. *Inventaire des plantes protégées en France*. Paris, Nathan.
- De Witte, L.C., Armbruster, G.F.J., Gielly, L., Taberlet, P., Stöcklin, J., 2012. AFLP markers reveal high clonal diversity and extreme longevity in four key arctic-alpine species. *Mol. Ecol.* 21, 1081–1097.
- Dearborn, D.C., Kark, S., 2010. Motivations for conserving urban biodiversity. *Conserv. Biol.* 24, 432–440.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Ehrich, D., 2006. AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Mol. Ecol. Notes* 6, 603–604.
- Fazey, I., Fischer, J., Lindenmayer, D.B., 2005. What do conservation biologists publish? *Biol. Conserv.* 124, 63–73.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

- Grimm, N.B., Faeth, S.H., Golubiewski, N.E., Redman, C.L., Wu, J., Bai, X., Briggs, J.M., 2008. Global change and the ecology of cities. *Science* 319, 756–760.
- Hardion, L., Verlaque, R., Baumel, A., Juin, M., Vila, B., 2012. Revised systematics of Mediterranean *Arundo* (Poaceae) based on AFLP fingerprints and morphology. *Taxon* 61, 1217–1226.
- Hardion, L., Verlaque, R., Fridlender, A., Vila, B., 2011. *Arundo*. In Marhold, K. (Ed.), IAPT/IOPB chromosome data 11. *Taxon* 60, 1221.
- Hegarty, M., Hiscock, S., 2007. Polyploidy: doubling up for evolutionary success. *Curr. Biol.* 17, 927–929.
- Lavagne, A., 1991. Etude sur les richesses naturelles végétales de la commune de Fréjus. Marseille, Université de Provence.
- Luck, G.W., 2007. A review of the relationships between human population density and biodiversity. *Biol. Rev.* 82, 607–645.
- UNFPA-United Nations Population Fund, 2007. State of world population 2007: unleashing the potential of urban growth, New York, United Nations Population Fund.
- McKinney, M.L., 2006. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biol. Conserv.* 127, 247–260.
- McKinney, M.L., Lockwood, J.L., 1999. Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends Ecol. Evol.* 14, 450–453.
- Médail, F., Diadema, K., 2006. Biodiversité végétale méditerranéenne et anthropisation : approches macro et micro-régionales. *Ann. Geo.* 651, 618–640.
- Médail, F., Diadema, K., 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *J. Biogeo.* 36, 1333–1345.
- Médail, F., Quezel, P., 1997. Hot-Spots Analysis for Conservation of Plant Biodiversity in the Mediterranean Basin. *Ann. Missouri Bot.* 84, 112.
- Médail, F., Verlaque, R., 1997. Ecological characteristics and rarity of endemic plants from southeast France and Corsica: implications for biodiversity conservation. *Biol. Conserv.* 80, 269–281.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.
- Naidoo, R., Balmford, A., Ferraro, P.J., Polasky, S., Ricketts, T.H., Rouget, M., 2006. Integrating economic costs into conservation planning. *Trends Ecol. Evol.* 21, 681–687.
- Olivier, L., Galland, J.C., Maurin, H., Roux, J.P., 1995. Livre rouge de la flore menacée de France: Tome 1: Espèces prioritaires. Paris, collection patrimoines naturels.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

- Quézel, P., 1985. La Flore du Bassin Méditerranéen : origine, mise en place, endémisme. *Ecologia Mediterranea* 11, 19-39.
- Reed, D.H., Frankham, R., 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* 17, 230–237.
- R Development Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, R foundation for statistical computing.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dole, S., Olivier, J.M., 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comput.* 7, 75–83.
- Van der Maarel, E., 2007. Transformation of cover-abundance values for appropriate numerical treatment - alternatives to the proposals by Podani. *J. Veg. Sci.* 18, 767–770.
- Verlaque, R., Fridlender, A., Aboucaya, A., 2002. Invasive alien flora of France: Ecology, life-forms and polyploidy. *Bot. Helv.* 112, 121–136.
- Verlaque, R., Médail, F., Aboucaya, A., 2001. Predictive value of life-forms for plant conservation in the Mediterranean area. *C. R. l'Acad. Sci. III* 324, 1157–1165.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. van de, Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23, 4407–4414.

Figures

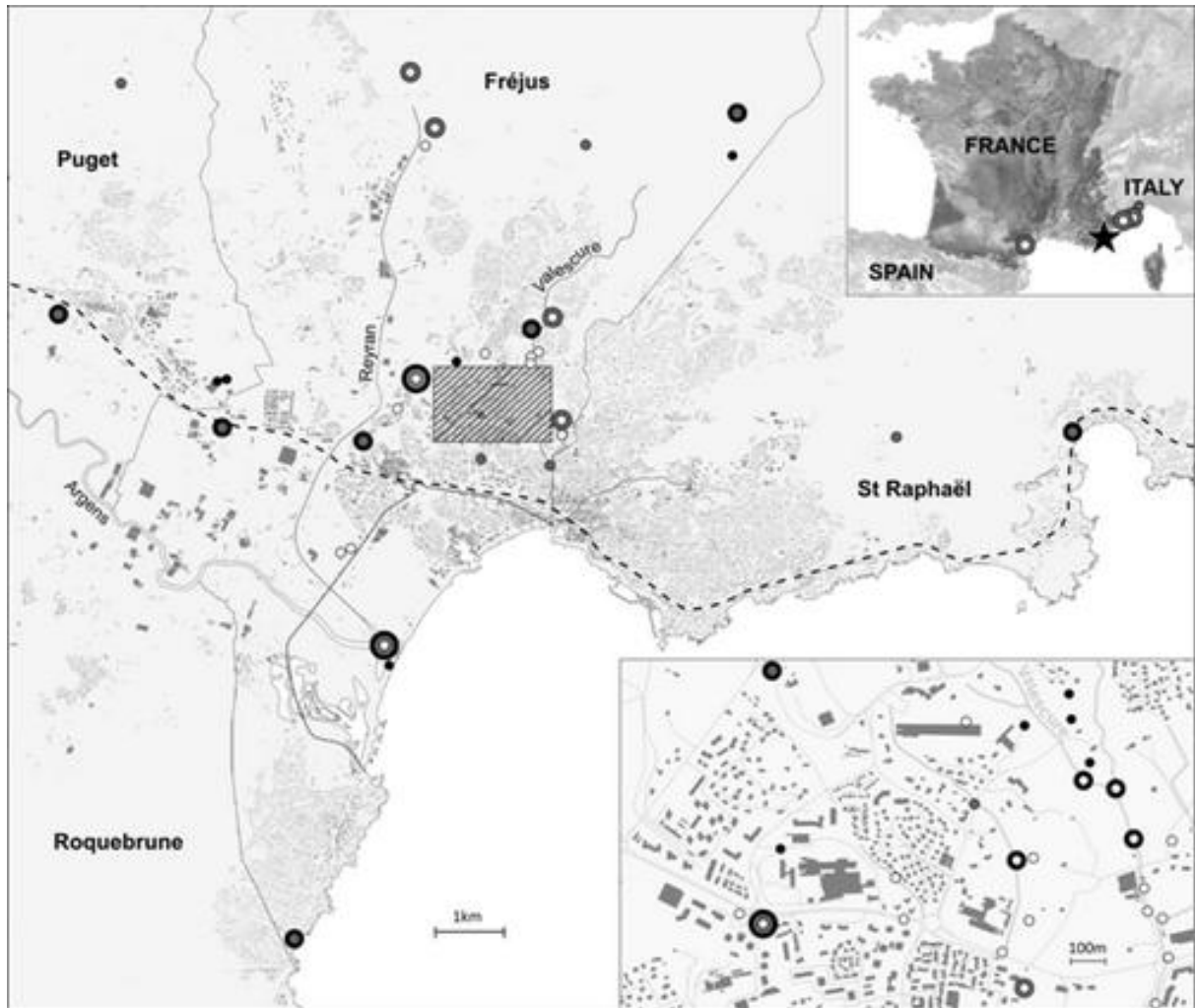


Figure 1. Localisation of study sampling among the sourrings of Fréjus (French Riviera, France) and within the study focus. White plot, soil sample; grey plot, genetic sample; black plot, floristic list.



Figure 2. Current distribution of *A. donaciformis* within the study focus (black surfaces; 2012), gathering of 70 188m² (*i.e.* 41.4% its whole distribution) in an urban context.



Figure 3. Past distribution of *A. donaciformis* within the study focus (black surfaces; 1991), including 166 840 m² of species surface. Urban structure from 2012.



Figure 4. Distribution of farmlands (brown), woods (green), urban area (red), wastelands (turquoise) and roads (blue) in 1949, 1991 and 2010 (up to down).

Tables

Table 1. Land cover and species distribution in pourcentages (and surfaces in 1×10^4 m²) across five years among the study focus (155.8×10^4 m²)

| Date | Farmland | Wasteland | Urban area | Roads | Woods | Species area |
|------|--------------|-------------|-------------|------------|-------------|--------------|
| 1926 | 70.4 (120.4) | 17.1 (29.2) | 3.7 (6.3) | 1.9 (3.2) | 6.9 (11.8) | - |
| 1949 | 69.3 (118.5) | 13.3 (22.7) | 7.2 (12.3) | 2.4 (4.1) | 7.8 (13.3) | - |
| 1971 | 52.7 (90.1) | 19.4 (33.2) | 16.1 (27.5) | 3.8 (6.5) | 8 (13.7) | - |
| 1991 | 11.7 (20.0) | 47.2 (80.7) | 25.7 (43.9) | 4.7 (8.0) | 10.7 (18.3) | 10.7 (18.4) |
| 2010 | 6.9 (11.8) | 26.6 (45.5) | 48.0 (82.1) | 8.7 (14.9) | 9.8 (16.8) | 4.5 (7.0)* |

*, 2012.

Table 2. Mean values and standard deviations (SD) of the 14 quantitative variables describing soils of the 50 largest *A. donaciformis* patches. Non-indicated units are in g/kg of dried soil, except water (in g/kg of fresh soil), pH and C/N (without unit).

| Soil variables | Means +/- SD |
|-------------------------------------|-----------------|
| Clay (< 2 μ m) | 149 +/- 90.4 |
| Fine silt (2-20 μ m) | 140.3 +/- 78.1 |
| Coarse silt (20-50 μ m) | 79.4 +/- 44.7 |
| Fine sand (50-200 μ m) | 135.3 +/- 55.0 |
| Coarse sand (200-2000 μ m) | 495.9 +/- 215.6 |
| Water (/fresh weight) | 84.6 +/- 44.3 |
| Organic matter | 22.0 +/- 16.6 |
| Organic carbon (C) | 13.0 +/- 9.6 |
| Nitrogen (N) | 0.89 +/- 0.76 |
| C/N | 15.3 +/- 3.6 |
| CaCO ₃ | 66.8 +/- 101.5 |
| pH | 7.9 +/- 0.67 |
| Conductivity (ms/cm) | 0.17 +/- 0.06 |
| Cation-exchange capacity (cmol+/kg) | 11.9 +/- 5.1 |

Appendix A. Supplementary material.

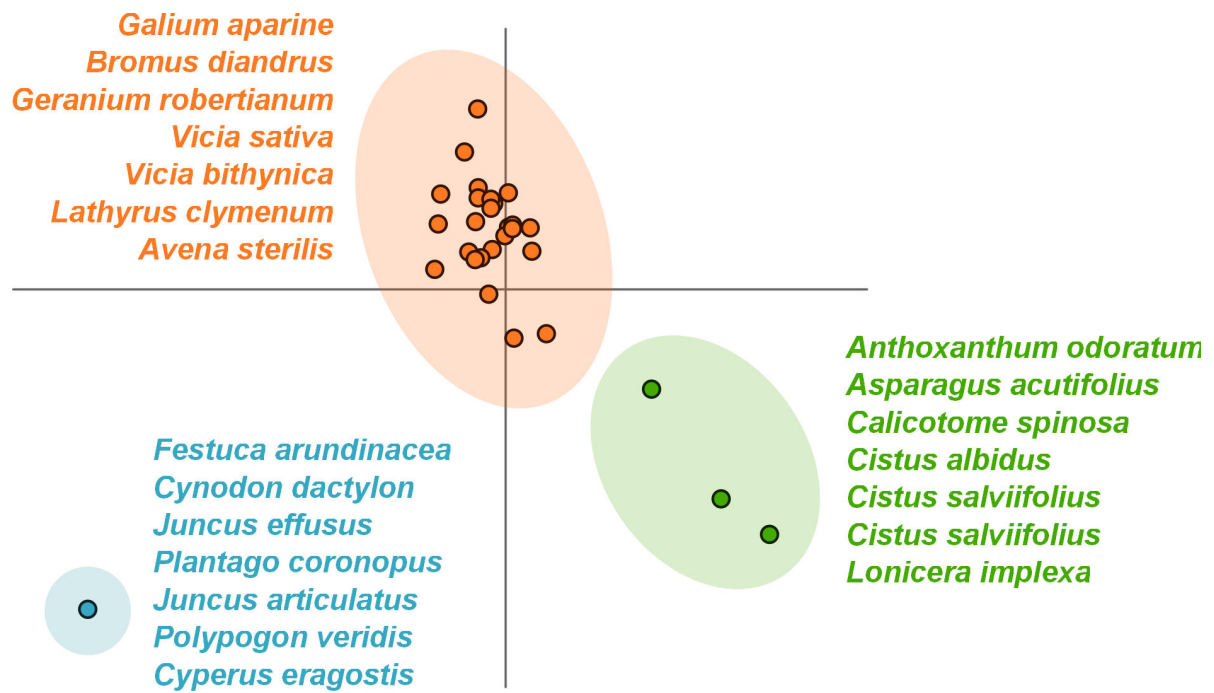
IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

Supplementary data 1. Qualitative description of environments occupied by *A. donaciformis* among its whole distribution (*i.e.* 314 patches)

| Variables | Modalities | % | Variables | Modalities | % |
|---|--------------------|----------|--|---------------------------------|----------|
| Altitude | - 10 < x < 10 | 47 | Boulders (> 256 mm) | Absence | 80.2 |
| | 10 < x < 30 | 34.2 | | Presence | 18.2 |
| | 30 < x < 50 | 16.6 | | Abundance | 1.6 |
| | > 50 | 2.2 | Cobbles (64-256 mm) | Absence | 50.8 |
| Orientation | South | 12.1 | | Presence | 40.6 |
| | East | 10.2 | | Abundance | 8.6 |
| | North | 8.9 | Pebbles (16-64 mm) | Absence | 19.8 |
| | West | 7.7 | | Presence | 49.8 |
| | none | 61 | | Abundance | 30.4 |
| Luminosity | Shade | 1.9 | Gravels (2-16 mm) | Absence | 4.5 |
| | Median | 27.2 | | Presence | 50.2 |
| | Exposed | 70.9 | | Abundance | 45.4 |
| Vegetal cover | Wood | 8.9 | Texture (USDA method) | Clay | 4.2 |
| | Shrube | 1.6 | | Silty | 28.4 |
| | Herbaceous | 89.5 | | Sandy | 8.3 |
| Pente | < 10° | 43.1 | | Balanced | 59.1 |
| | 10 < x < 23° | 27.8 | Form of rough elements | Flattened angular | 6.7 |
| | 23 < x < 45° | 19.5 | | Flattened subangular | 3.8 |
| | > 45° | 9.6 | | Spherical angular | 23.1 |
| Organic matter | Absence | 9.9 | | Spherical subangular | 54.8 |
| | Presence | 56.5 | Spherical curved | 4.2 | |
| | Abundance | 33.5 | None | 7.4 | |
| [CaCO₃] (HCl effervescence) | Absence | 31 | Structure of rough elements | Lumpy | 80.5 |
| | Presence (weak) | 15.3 | | Polyedric | 16 |
| | Abundance (strong) | 53.7 | | None | 3.5 |
| pH (indicator paper) | < 4 | 2.2 | Porosity (soil aeration) | Absence | 3.5 |
| | 4 < x < 5 | 6.4 | | Presence | 36.1 |
| | 5 < x < 6 | 70.6 | | Abundance | 60.4 |
| | 6 < x < 7 | 15.3 | Density (test of blade penetration) | Loose (whole blade) | 1.6 |
| | > 7 | 5.4 | | Few compact (whole with effort) | 52.1 |
| Colour (code Munsell) | Red-brown 2.5R | 0.6 | Compact (not entirely) | 29.4 | |
| | Brown-red 5YR | 4.8 | Massive (< 2 cm) | 16.9 | |
| | Brown 7.5YR | 92 | | | |
| | Brown-yellow 10YR | 1.6 | | | |
| | Grey | 1 | | | |

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit G

Supplementary data 2. First plan of the correspondence analysis on floristic data (7.8 and 7.4% of the total inertia), and the seven most common species in each floristic clusters.



IV. Conservation d'A. donaciformis à Fréjus : manuscrit G

Title: Impact of polyploidy on the balance between clonality and fertility in the genus *Arundo*

(article in preparation)

Laurent Hardion¹, Marcela Rosato², Régine Verlaque¹ and Bruno Vila¹, Josep A. Rosselló²

Address: ¹ Aix Marseille University, CNRS, IMBE UMR 7263, 13331, Marseille, France;

² Jardín Botánico de Valencia, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

Material & Methods

Plant materials

This study is based on a Mediterranean sampling of the genus *Arundo* from a previous taxonomic study, including species and cytotypes previously mentioned and a fourth species, the circum-Mediterranean *A. micrantha* ($2n = 12X$). Rhizomatous samples collected in the wild between years 2010 and 2011 were then planted in the botanical garden of Aix-Marseille University. Numerous localities representing the four taxa and the two ploidy levels (12 and 18X; see details in Hardion *et al.* 2012) were randomly transplanted in a square parcel, 0.5 m apart from one another. During flowering periods (*i.e.* Sept.-Oct. 2011-2012), spikelets were horizontally cut and fixed in a 3:1 alcohol-acetic acid solution every week.

Microgametogenesis, pollen viability and *in vitro* germination

After at least two weeks of storage at room temperature, fixed material was kept at -20°C until used. Before observations, spikelets were boiled in acetocarmine stain during 3 minutes. Anthers were then dissected from floret, squashed between slide and cover slide, and observed using a Leitz Dialux 20 microscope (Leitz, Munich, Germany), equipped with a Canon EOS 550D camera (Canon USA Inc., Lake Success, NY, USA). Meiotic anomalies and metaphasis of pollen mitosis were screened and described for each cytotypes and species. Finally, the diameter of mature pollen was measured to evaluate the impact of DNA content on cellular size, and its average was estimated on 30 grains per sample.

During the pollination, pollen release were manually triggered from freshly opened florets in the morning, collected in Petri dishes with germination medium composed of 1% (w/v) agar, 15% sucrose, 0.01% boric acid, 0.02% calcium nitrate and 0.02% magnesium

sulphate, and incubated at 25°C for 3h. Then, pollen walls and cytoplasm were differentiated using Alexander's stain, and the percentage of fully stained pollen was estimated as an indication of pollen viability (Dafni & Firmage 2000). Also considered as viable pollen, pollen germinations were considered when pollen tube exceeds grain diameter, and estimated as a percentage.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of rDNA loci

The two multigene families of rDNA were localized with two different DNA probes. Clone pTa71 is a 9-kb EcoRI fragment containing the 18S–5.8S–26S rDNA genes and the intergenic spacer regions from *Triticum aestivum* (Gerlach and Bedbrook, 1979). The 5S rDNA was localized using clone pTa794, containing a 410-bp BamHI fragment of the 5S rDNA gene and intergenic spacer from *T. aestivum* (Gerlach and Dyer, 1980). The 5S rDNA fragment was amplified with the universal primer M13 forward and reverse. PCR products were purified using Montage PCR Centrifugal filter devices (Millipore). The pTa71 and pTa794 probes were labelled with either digoxigenin-11dUTP or biotin-11-dUTP by nick translation based on the protocols of the manufacturer (Hoffman-La Roche, Bale, Switzerland).

After a cold treatment of 4°C for one day, root tips from cultivated rhizomes were fixed with a 3:1 alcohol-acetic acid solution, stored at room temperature for two weeks, and at -20°C until used. Material was washed in citrate buffer (10 mM, pH 4.6), and macerated for 1 h at 37°C in a solution of 2% (v/v) cellulase (Calbiochem) in citrate buffer, and 20% pectinase in 40% glycerol in citrate buffer. Slides were stained with 4% Giemsa solution diluted with Sørensen phosphate buffer (0.2 M; pH 6.9).

FISH protocol followed Chiavarino *et al.* (2000) with slight modifications: chromosome preparations stored at 37.8°C overnight were incubated in RNase A (1 mg mL⁻¹) in 2x SSC for 1 h at 37.8°C. The slides were then 3 fold-rinsed for 5 min in 2x SSC, fixed in 4% paraformaldehyde in 1x SSC for 10 min at room temperature, 3 fold-washed for 5 min in 2x SSC, and dehydrated in three ethanol concentrations (75, 95, and 100%). Prior to hybridization, the chromosome preparations were denatured in 70% (v/v) formamide in 2x SSC at 68.8°C for 2 min, dehydrated with inverted ethanol series and air-dried. The hybridization mixture, containing 2 mg/mL of each labelled probe, was denatured by boiling for 10 min, quenched on ice for 7 min, and added to the denatured chromosome preparations. Hybridization was carried out overnight at 37.8°C in a humid chamber. Post-hybridization washes of the slides were done two times for 2 min at 42.8°C in 2x SSC, two times for 5 min at 42.8°C in 0.1x SSC, and three times for 3 min at 42.8°C in 2x SSC. Digoxigenin-labelled

probe detection was performed with anti-digoxigenin antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (Hoffman-La Roche). Biotin-labelled probe detection was performed with streptavidin conjugated with Texas Red (Vector Laboratories, Peterborough, UK). After detection, the slides were 2 fold-rinsed for 5 min at 37.8°C and one time at room temperature in detection buffer [4x SSC, 0.2% (v/v) Tween 20]. Finally, DAPI counterstaining was lead on slides mounted in Vectashield (Vector Laboratories). Fluorescent signals were detected using an Olympus fluorescence microscope with Camedia C-2000-Z digital camera (Olympus, Tokyo, Japan). The images were optimized for best contrast and brightness on Adobe Photoshop v.7.0 (Adobe, San Jose, CA, USA).

Self-incompatibility and caryopsis occurrence

Self-incompatibility in angiosperm can be optimally investigated by cross-pollination between differentiated genotypes. But these experimental methods become challenging for biological models with miniaturised flowers releasing anthers and pollen simultaneously. In perennial grasses, self-incompatibility is often evidenced on the pistil by the absence of pollen germination, or by the accumulation of callose limiting the migration of pollen tube in the stigma (Richard 1997). Based on the genotypic admixed conditions of botanical garden, freshly opened spikelets were entirely fixed in the 3:1 alcohol-acetic acid solution at 12 AM, stored two weeks at room temperature, and then at -20°C until used. After dissection of fixed florets, pistils were rehydrated by an ethanol series (70, 50, 30%) and washed with distilled water, each step for 5 min. Subsequently, samples were incubated in 8 M sodium hydroxide solution at 60°C during one hour. Pistils were then stained with 0.1% aniline blue (w/v) in potassium phosphate during one hour at room temperature, and then mounted in staining solution between slide and cover slide. Samples were observed under near UV excitation.

In addition, percentage of caryopsis occurrence was estimated on 15 florets per panicle for at least 10 panicles collected in the botanical garden during winters 2011-2012, and then averaged per species cytotype. These percentages were compared to similar data estimated on specimens collected in the wild, where patches of *Arundo* are known to be highly monoclonal (Hardion *et al.* 2012; Hardion *et al.* in prep.).

Results

Normal proceeding of meiosis and viable pollen were observed for every species cytotypes, despite percentages strongly differ between them (Table 1, Fig. 1). High rates of pollen viability were found for *A. donaciformis* ($2n = 18X$) and the two cytotypes of *A. plinii* ($2n = 12X$ and $18X$), with respectively 80.8, 84.6 and 86.8% of stained grains, and pollen germination were also observed for three modalities, with 10.6, 7.8 and 8.0%, respectively (Fig. 1A & D). In opposition, very low pollen viability (3.7 and 6.2% respectively) and no pollen germination were evidenced for *A. micrantha* ($2n = 72$; Fig. 1C) and *A. donax* ($2n = 108$; Fig. 1B). Moreover, these low values must be pondered by the high percentage of empty stamens at the start of anthesis for the two previous taxa (84.1 and 91.3% respectively), phenomena rarely observed on the other species. Pollen size is not induced by ploidy level (t-test, $p > 0.05$) and stronger variations were seen between samples of the same species cytotype than between cytotypes. Macropollen were not frequent enough to be statistically differentiated, but they were observed for each cytotypes (*i.e.* *A. micrantha*; fig.1C). Despite some aneuploid events, chromosome counts on pollen mitosis of high cytotypes ($2n = 18X \sim 108$) mathematically support the success of meiosis steps, *i.e.* reductional and equational divisions, leading to the formation of gametes with $n \sim 54$ (Table 1; Fig. 1E, F & G).

Table 1. Cytogenetic data and pollen characteristics among *Arundo* taxa, including ploidy level ($2n$), DNA content ($2C$), numbers of 5S and 45S rDNA loci (FISH), number of NORs, haploid number on pollen mitosis (n), pollen diameters (\emptyset), and percentages of pollen viability (Alexander staining), *in vitro* germinations and fructiferous spikelets in the wild (*in situ*) and in genotypic admixture (in botanic garden, *ex situ*).

| Taxon | $2n$ | $2C$ | FISH 45S | FISH 5S | NORs | n | Pollen \emptyset (μm) | % viability | % ger- mination | % seed <i>in situ</i> | % seed <i>ex situ</i> |
|------------------------|-------------|---------------|-------------|------------|------|----------------|---|----------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>A. micrantha</i> | 12X ~72 | 3.2 ± 0.1 | 4 | 4 | 4 | - | 29.1 ± 1.5 | 3.7 | 0* | 0* | 0* |
| <i>A. plinii</i> - 12X | 12X ~72 | 3.4 ± 0.2 | 4 | 4 | 4 | - | 30.0 ± 2.6 | 84.6 | 7.8 | 9.2 | 7.3 |
| <i>A. plinii</i> - 18X | 18X ~108 | 4.8 ± 0.2 | 6 | 6 | 6 | 56 | 39.6 ± 4.6 | 86.8 | 8.0 | 0* | 5.2 |
| <i>A. donaciformis</i> | 18X ~108 | 4.7 ± 0.1 | 4 | 4 | 4 | 50-54 60-62 | 33.7 ± 1.8 | 80.8 | 10.6 | 0* | 6.4 |
| <i>A. donax</i> | 18X ~108 | 4.9 ± 0.1 | 6 | 6 | 6 | 54 | 32.2 ± 4.0 | 6.2 | 0* | 0* | 0* |

$2n$ and $2C$ values from literature (Hardion *et al.* 2011, 2013). *, character never observed.

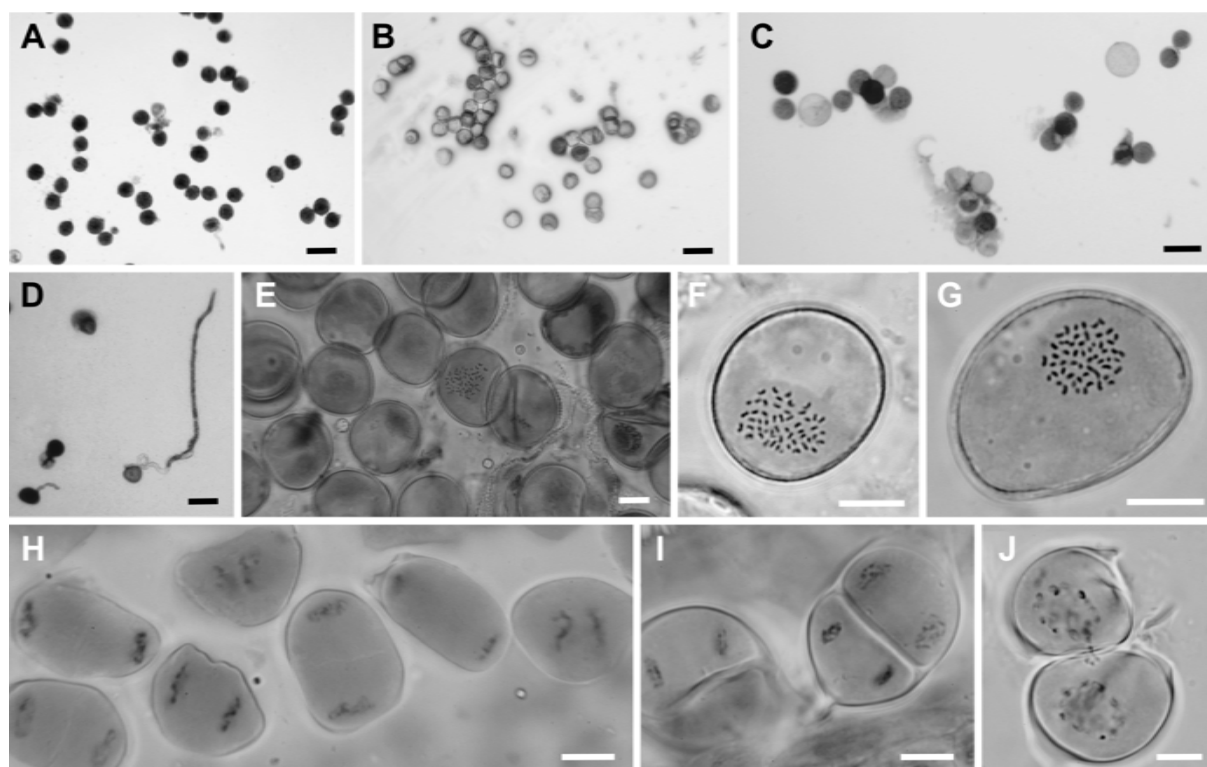


Figure 1. Observations of meiosis, pollen mitosis, viability and germination. A, pollen of *A. plinii* with $2n = 12X$; B, pollen of *A. donax* ($2n = 18X$); C, pollen of *A. micrantha* ($2n = 12X$); D, pollen germination of *A. plinii* with $2n = 18X$; E, pollen mitose (metaphase, $n = 54$) of *A. donaciformis* ($2n = 108$); F, pollen mitose (metaphase, $n = 56$) of *A. plinii* with $2n = 18X \sim 108$; G, pollen mitose (metaphase, $n=54$) of *A. donax* ($2n = 18X \sim 108$); H, meiosis (anaphase I) of *A. plinii* with $2n = 12X$; I, meiosis (anaphase II) of *A. plinii* with $2n = 12X$; Chromosome exchange between to meiocytes of *A. micrantha* ($2n = 12X$). Black scale bars, 50 μm ; white bars, 10 μm .

Cytogenetic data clearly distinguish two cytotype combinations based on numbers of rDNA regions, which mainly correspond to the two polyploid levels, excepted for *A. donaciformis* (Table 1). The two $2n = 12X$ cytotypes (*A. micrantha* and *A. plinii*) exhibit four 5S and four 45S rDNA loci versus six and six for the $2n = 18X$ cytotypes of *A. donax* and *A. plinii* (Fig. 2). However, *A. donaciformis* did not follow the logical series of polyploidy, with only four 5S and 45S rDNA loci despite its high cytotype ($2n = 18X$). These data are supported by the maximum number of NORs observed by species cytotypes.

Caryopsis production in the wild is restricted to $2n = 12X$ cytotypes of *A. plinii* (9.2 % of fructiferous spikelets; table 1). However, genotypic admixture in the botanic garden induced fructiferous panicles for two $2n = 18X$ species cytotypes, *A. donaciformis* and *A. plinii* with 18X. In the two conditions, *A. micrantha* and *A. donax* remains non-fructiferous.

IV. Conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus : manuscrit H

These results are also supported by the observations of pollen germination and migration under pistils (Fig. 3). These experience show weak number of pollen tube formed on stigma, but also some rare occurrence of successful pollen tube migration along the style tract for *A. donaciformis* and the two cytotypes of *A. plinii*, absent for *A. donax* and *A. micrantha* (Fig. 3).

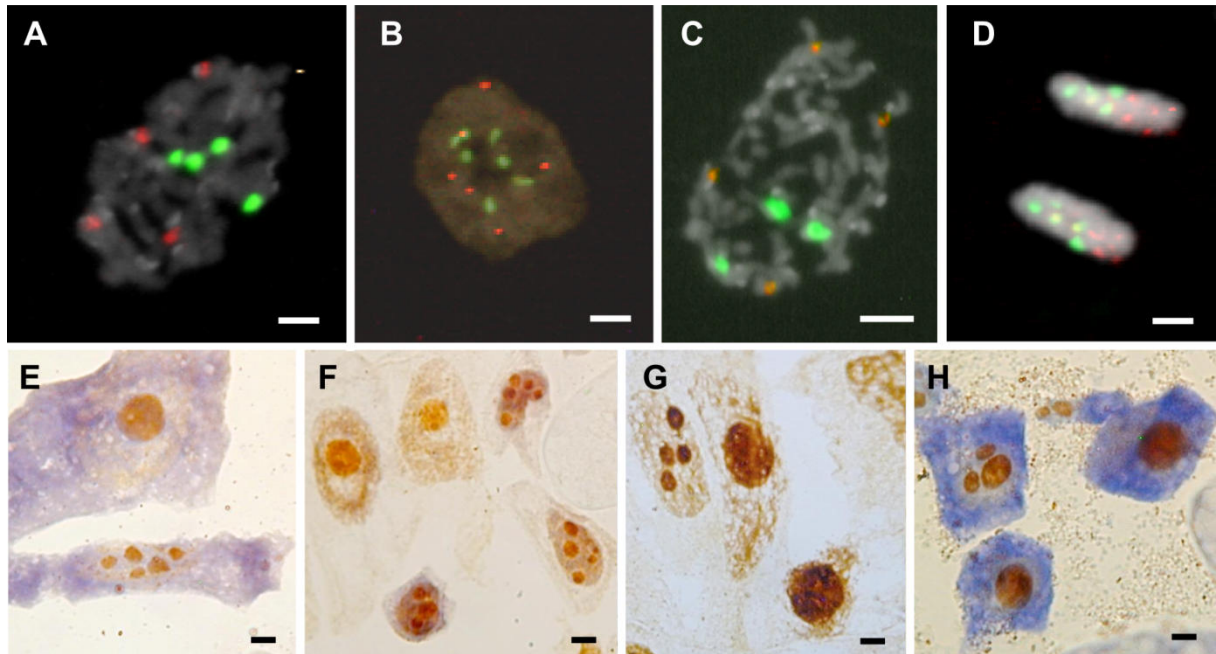


Figure 2. Fluorescent *in situ* hybridization with 5S (red) and 45S (green) rDNA probes on root cells counterstained with DAPI (A-D), and Ag-staining of NORs on root tips (E-H). A, Prophase of *A. plinii* with $2n = 12X$; B, prophase of *A. donax* ($2n = 18X$); C, metaphase of *A. micrantha* ($2n = 12X$); D, anaphase of *A. donaciformis* ($2n = 18X$), E, *A. plinii* with $2n = 18X$; F, *A. donax* ($2n = 18X$); G, *A. plinii* with $2n = 12X$; H, *A. donaciformis* ($2n = 18X$). White scales bars = 2 μm .

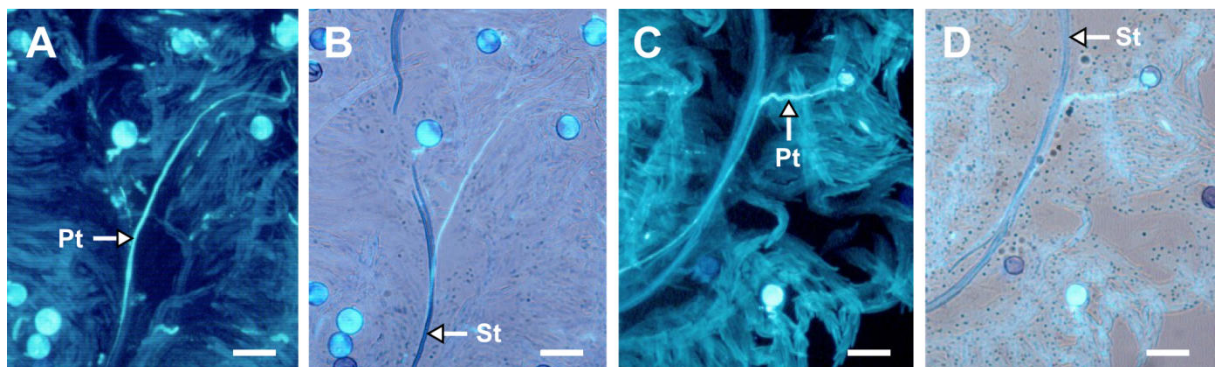
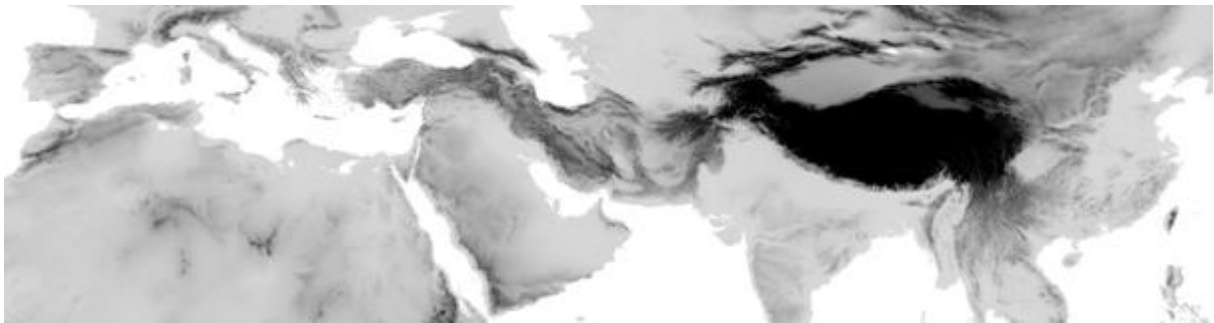


Fig. 3. Pollen germination under the stigma, stained with aniline blue. A (100% fluorescence) & B (50% fluorescence, 50% light microscopy), pollen tube (Pt) growth in the plumose stigma of *A. donaciformis* ($2n = 18X$) along the style tract (St). C & D, same observations for *A. plinii* with $2n = 18X$. Scale bars = 50 μm .

V. Origine des clones méditerranéens d'*Arundo donax* et *A. micrantha* en Asie



Synthèse et perspectives

Annexes

- **Manuscrit I** : Hardion & Leriche. *in prep.* Plant distribution on Google Street View
- **Manuscrit J** : Hardion *et al.* *in prep.* Origin of the invasive *A. donax*

La révision systématique du genre *Arundo* en Méditerranée a mis en évidence la présence de deux espèces circumméditerranéennes non fructifères, *A. donax* et *A. micrantha*, chacune caractérisée par un seul génotype (Hardion *et al.* 2012). Malgré leur forte différenciation morphologique et génétique, leur uniformité génétique, associée à l'absence de propagation par reproduction sexuée en Méditerranée, paraît assez exceptionnelle pour des espèces supposées indigènes (Vendramin *et al.* 2008). Il s'agirait donc plutôt de deux taxons clonaux introduits. Afin de cerner leurs origines, nos travaux se sont élargis vers l'Asie, ouvrant ainsi plusieurs pistes d'investigation en systématique et phylogéographique, voire même en biologie des invasions et en archéologie. Cependant, le problème majeur de ces recherches a été, d'une part l'étonnant polymorphisme des *Arundo* d'Asie, et d'autre part la présence du seul binôme « *A. donax s. l.* » dans toutes les flores locales, suite à l'avis du célèbre botaniste Hooker (1890) déniaut toute valeur aux nombreux autres taxons précédemment décrits (y compris *A. plinii*).

Décrit et localisé par Linné en Espagne et France méridionale, *A. donax* s'étend sur une vaste aire subtropicale méditerranéo-asiatique, d'où ses divers noms vernaculaires : canne de Provence, d'Espagne, de Perse... Par contre, dans d'autres régions chaudes du globe, elle figure parmi les espèces invasives, notamment en Amérique où croît pourtant le même clone qu'en Languedoc (Ahmad *et al.* 2008). Basé sur l'hypothèse de l'effet de fondation sur la diversité génétique des taxons introduits, son absence de diversité en Méditerranée suggère une origine asiatique, comme l'indiquent les travaux de Mariani *et al.* (2010). En effet, leur analyse phylogénétique d'empreintes AFLP, basée sur 77 échantillons d'herbier, montre la divergence plus ancienne des plantes asiatiques. Or étrangement, leurs résultats signalent une diversité génétique non négligeable en Méditerranée, et presque équivalente à celle qu'ils trouvent en Asie. Toutefois, ces données doivent être relativisées, en raison des multiples difficultés et limites inhérentes à l'utilisation d'empreintes moléculaires à partir d'échantillons d'herbiers anciens (Lambertini *et al.* 2008). Basées sur les variations des tailles de fragments d'ADN, ces méthodes peuvent être fortement biaisées par la dégradation naturelle du matériel, avec le temps et selon les conditions de séchage des plantes. Pour confirmer l'hypothèse d'une introduction ancienne en Méditerranée, il convient donc de renforcer l'absence de diversité avec d'autres marqueurs moléculaires, puis de localiser le(s) centre(s) de différenciation d'*A. donax s. l.* en Asie, voire même de situer l'origine du clone invasif.

En l'état actuel des connaissances morphologiques et génétiques, la seconde espèce introduite *A. micrantha* pose un réel problème, puisqu'il s'agit d'une circum-méditerranéenne stricte. Longtemps réuni à *A. plinii s. l.*, ce taxon demeure très méconnu comme en témoigne les nouvelles stations trouvées durant notre étude. De plus, de par sa robustesse, il a aussi pu être confondu avec *A. donax*. A l'instar de ce dernier, l'origine d'*A. micrantha* aurait pu se trouver à l'Est de la Méditerranée, comme le laissait penser, à tort, l'observation de certains échantillons d'herbier du Moyen-Orient. Bien qu'identifiées sous le nom d'*A. donax*, voire d'*A. mauritanica* (G00163764), ces plantes possédaient des pièces florales de tailles intermédiaires entre celles des deux clones méditerranéens.

En élargissant nos recherches de systématique à l'Asie, notre but principal est donc de déterminer l'origine d'*A. donax* et d'*A. micrantha*. Cette étude couvre plusieurs objectifs entrecroisés : (i) d'abord, rechercher des centres de diversité génétique pour chacune d'elle, et leurs plus proches parents phylogénétiques; (ii) puis, amorcer un travail de systématique permettant de classer la variabilité morphologique et génétique présente en Asie ; (iii) enfin, lier ces deux objectifs à l'impact de phénomènes parallèles comme la polyploïdie, prépondérante dans le genre *Arundo*, et la sélection/dispersion des espèces utiles par l'Homme, potentiellement active depuis le Néolithique. En effet, *A. donax* fait partie intégrante des paysages de Méditerranée, où il constitue toujours un important auxiliaire de l'agriculture et de l'élevage.

La distribution asiatique du genre *Arundo* s'étend du Proche- et Moyen-Orient, au Sud de l'Himalaya, au Nord de l'Inde, au Sud de la Chine, jusqu'à Taïwan et au Sud du Japon. L'échantillonnage *in situ* d'une telle aire représente un travail de terrain colossal et non prévu dans la conception initiale de cette thèse. Outre les raisons spatio-temporelles et financières, la prospection de plusieurs pays du Moyen-Orient s'avère actuellement dangereuse et interdite par les autorités françaises de recherche. Pour nous procurer le matériel nécessaire à notre étude, nous avons donc visité plusieurs herbiers européens et demandé en prêt de nombreux échantillons issus de ces grandes collections (B, BM, E, G, K, P, W). Basés sur 126 exsiccata, nous avons d'abord mené des analyses phylogénétiques à l'aide de 5 séquences d'ADN chloroplastiques comportant plusieurs sites mini- et microsattellites (Saltonstall 2001). Ayant l'avantage d'un séquençage précis, ces marqueurs évitent les biais liés à la dégradation de l'ADN, tout en affichant des taux de mutations équivalents à ceux des microsattellites nucléaires classiquement utilisés en génétique des populations (1.10^{-3} pour les mini- et 1.10^{-5}

pour les microsatellites d'ADNcp d'Orchidaceae vs. 1.10^{-9} pour les substitutions d'ADNcp ; Cozzolino *et al.* 2003 ; Wolfe *et al.* 1987). Notons cependant que sur les 104 exsiccata d'Asie testés, seuls 34 ont fourni des informations génétiques. Afin d'élargir les descriptions taxonomiques, des mesures et observations morphologiques ont été réalisées sur les pièces florales, les parties végétatives et les épidermes (face foliaire inférieure) pour l'ensemble de l'échantillonnage. Ces investigations nous ont aussi permis de localiser des individus fructifères en Asie, et d'établir leur niveau de ploïdie indirectement grâce à la taille des stomates comme cela est souvent réalisé sur herbier (*e.g. Phragmites* ; Hansen *et al.* 2007), et même sur des plantes fossiles (Masterson 1994).

Par ailleurs, la niche écologique des espèces a été établie afin d'estimer leur distribution potentielle, et donc de déterminer des aires d'origine probable en Asie. Finalisée uniquement pour *A. donax*, cette analyse se base sur 3429 points GPS en Méditerranée, et sur cinq variables bioclimatiques choisies selon les connaissances sur l'écologie d'*A. donax*. Outre celles notées sur les exsiccata, les indications de présence ont été collectées *in silico* grâce à d'importantes bases de données d'herbier, mais aussi par des institutions nationales comme le Conservation Botanique National Méditerranéen. Lors de la récolte des coordonnées GPS, un sérieux biais d'échantillonnage est apparu en Méditerranée centrale, avec presque aucune donnée sur *A. donax* en Italie, Corse, Sardaigne et Sicile. Pour pallier ce problème, nous avons proposé une méthode originale de géolocalisation basée sur la reconnaissance assez facile de cette espèce emblématique, ainsi que la disponibilité de données photographiques géoréférencées précises et en abondance sur le service Google Street View (Google Inc., Mountain View, CA, USA). Ceci nous a permis d'ajouter 137 points de présence régulièrement répartis sur l'Italie et les trois principales îles voisines.

Origine restreinte et dispersion ancienne de l'archéophyte *Arundo donax*.

L'haplotype du clone invasif d'*A. donax* se rencontre dans la totalité des stations méditerranéennes étudiées, mais aussi dans plusieurs sites perses. En plus de confirmer l'absence de diversité génétique de ce cytotype à $2n = 108$ en Méditerranée, ces résultats élargissent son uniformité génétique vers l'Est jusqu'à l'Iran (Centre et surtout Nord). Par ailleurs, sur l'ensemble de l'aire eurasiatique, les séquences d'ADNcp décrivent « *A. donax s. l.* » comme une espèce polyphylétique, scindée en deux lignées principales Est et Ouest. En outre, chacune d'entre elles est subdivisée en deux clusters géographiques : Moyen-Orient, Ouest, Centre et Est Himalaya. Basée sur les substitutions et les sites mini- et microsatellites,

l'analyse phylogénétique place l'haplotype du clone invasif dans le cluster du Moyen-Orient, à coté des trois échantillons Afghans et Pakistanais (vallée de l'Indus) assez grêles porteurs de graines et probablement à $2n = 72$. En analysant seulement les substitutions, ces derniers sont même similaires au clone invasif, mais morphologiquement, ils en diffèrent par leurs tailles nettement inférieures. Cette distinction semble résulter de l'effet de gigantisme induit par la polyploïdie sur le clone introduit non fructifère à $2n = 108$. Bien que génétiquement non définis, d'autres individus du Moyen-Orient situés au Sud-Ouest de l'Iran (Fars) possèdent aussi une morphologie plus frêle et portent des graines, ce qui pourrait potentiellement élargir l'origine du clone invasif de la vallée de l'Indus à tout le Sud Zagros en Iran. L'absence de diversité génétique d'après l'ADNcp confirme donc le statut d'archéophyte d'*A. donax* de la Méditerranée au Moyen-Orient.

Plaçant ses proches parents au Sud du croissant fertile (Zagros) c'est-à-dire à l'Est de la Mésopotamie, *i.e.* des sites jalonnant les grandes routes commerciales de l'Antiquité qui reliaient les plus anciennes et prestigieuses civilisations orientales. Depuis l'Hindu Kusch jusqu'à la Méditerranée par le Nord de la Perse, ou par la vallée de l'Indus, le Sud de l'Iran et la Mésopotamie (Figure 24). Cette transplantation pourrait être associée à ses multiples utilisations lors de l'expansion de l'agriculture et de l'élevage (huttes, drainage, palissades, tuteurs, coupe-vent, aliment, fourrage, combustible...), puis durant la révolution urbaine de la fin du IV millénaire, pour les constructions (chainage des ziggurats, bateaux de commerce...), l'armement, la médecine, les calames de l'écriture cunéiforme... Ces résultats pourraient soutenir l'hypothèse d'une des plus anciennes invasions biologiques, fin Néolithique.

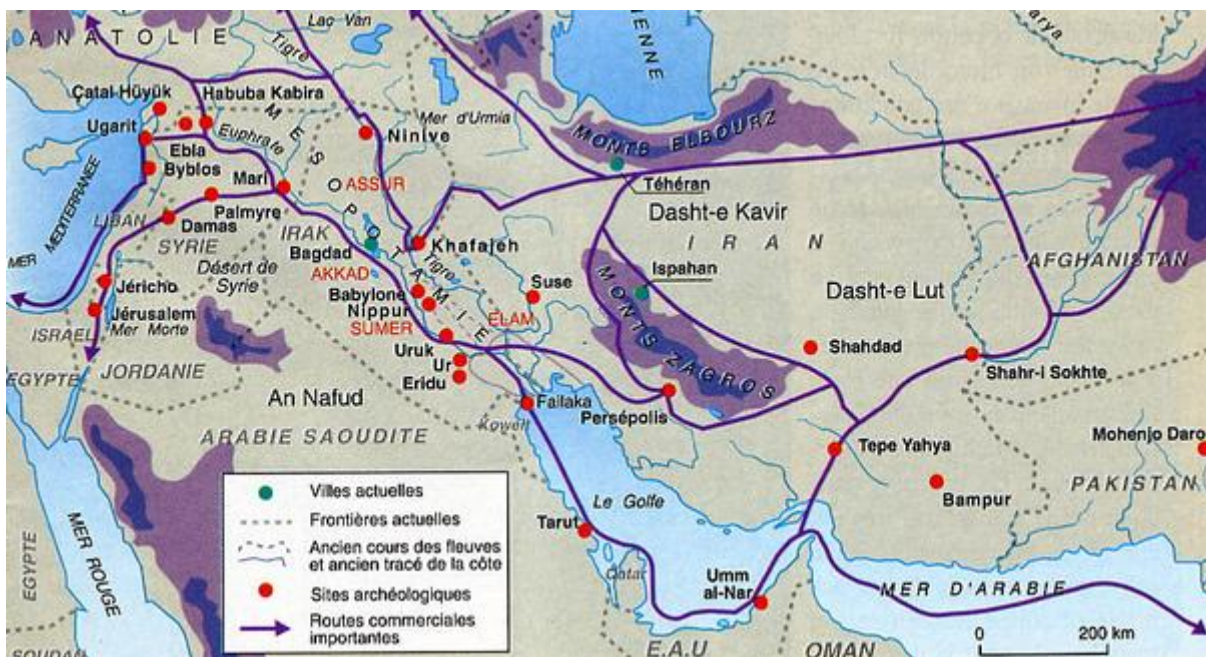


Figure 24. Routes antiques en Orient (source : Historia, hors série).

Origine mystérieuse et dispersion hypothétique d'*Arundo micrantha*.

Les résultats phylogénétiques issus de l'analyse des séquences d'ADNcp n'ont pas révélé la présence de proches parents de cette espèce en Asie. Au contraire, leur forte structuration géographique restreint l'haplotype d'*A. micrantha* au seul cluster méditerranéen. Malgré sa vaste distribution circum-méditerranéenne, l'espèce demeure partout plutôt rare, à l'exception du Levant, de la Crète et du Maghreb. Bien que globalement large, notre échantillonnage reste assez restreint et n'exclut en rien la présence d'individus génétiquement dissemblables dans ces régions et surtout dans des zones non prospectées, Ouest Turquie notamment. Grâce à la distinction morphologique maintenant possible avec notre révision taxonomique, la distribution d'*A. micrantha* devrait à l'avenir être améliorée par les botanistes méditerranéens (*e.g.* pour l'Italie, Mascia *et al.* 2012). Toutefois, la présence d'un seul génotype non fructifère tout autour de la Méditerranée pose de sérieuses interrogations sur ses moyens de dispersion. De par sa robustesse, *A. micrantha* a pu lui aussi être transplanté par l'Homme, peut-être avec *A. donax* depuis l'Orient ou le Levant. Son utilisation persiste d'ailleurs encore dans certaines régions, par exemple en Sardaigne sous le nom de 'canna male', pour la confection d'instruments à vents appelés Launeddas (triple flûte), descendants de l'antique « Aulos » : double flûte d'Athéna. A l'instar de la dispersion supposée anthrope d'*A. donax*, *A. micrantha* a pu être naturalisé en de nombreux points de la Méditerranée, sans toutefois devenir invasif compte tenu de ses plus importants besoins en eau. Par ailleurs, il est frappant de constater la corrélation entre sa distribution géographique et celles des comptoirs Phéniciens partout en Méditerranée, surtout au voisinage de filons métallifères, notamment là où *A. plinii* ne pousse pas. Si tel était le cas, l'introduction pourrait remonter à la fin du second jusqu'au milieu du premier millénaire avant notre ère, c'est-à-dire après celle supposée de la canne de Provence. En raison de l'absence de macro-restes de l'époque et du manque d'archives phéniciennes, cette hypothèse demeure bien difficile à prouver.

Vers une révision taxonomique du genre *Arundo* en Asie.

Les marqueurs morphologiques s'avèrent historiquement fondamentaux pour les travaux de systématique, et le genre *Arundo* ne fait pas exception, avec des variations morphologiques parfois plus informatives que l'étude de la divergence génétique (Cf. différenciation d'*A. donaciformis*). Appliqués à la systématique du genre en Asie, les données morphométriques obtenues ici distinguent trois entités : (i) un taxon méditerranéo-persan robuste correspondant au clone invasif d'*A. donax s.s.* ; (ii) un vaste complexe intermédiaire

regroupant les individus sino-himalayens, auxquels s'ajoutent les plus proches parents phylogénétiques d'*A. donax* et quelques individus de Taïwan; et (iii) l'endémique taïwanaise *A. formosana*, très caractéristique par ses très petites dimensions. Si ce découpage paraît biogéographiquement cohérent, sa confrontation avec les résultats d'ADNcp pose certains problèmes. En effet, ces données phylogénétiques scindent elles aussi "*A. donax s.l.*" en deux entités Est-Ouest, plaçant la distinction à la frontière Ouest du Népal (Penjab), au centre-sud de l'Himalaya. Or, les plus proches parents du clone invasif présentent le morphotype sino-himalayen et probablement un cytotype à $2n = 72$. La différenciation morphologique du clone invasif pourrait s'expliquer par un phénomène de gigantisme lié à la polyploïdie. A peine ébauchée ici, la révision systématique complète du genre *Arundo* en Asie paraît bien nécessaire, mais malheureusement irréalisable en l'état. Si les caractères qualitatifs (port, indument du matériel frais, rhizomes...) se sont révélés hautement discriminants lors de la révision taxonomique du genre en Méditerranée, nous n'avons pas pu les utiliser dans ce chapitre, compte tenu des impératifs d'analyse statistique et du matériel d'herbier fragmentaire (par exemple l'absence de rhizome). De plus, les données quantitatives utilisées sont hautement biaisées par les augmentations de tailles liées à la polyploïdie. Basé sur un échantillonnage de matériel vivant conséquent, ce travail devra associer à des données morphologiques et chromosomiques, des marqueurs nucléaires hautement résolutifs, comme l'a été l'AFLP lors de notre travail en Méditerranée.

Annexes

Manuscrit I

Title: Plant distribution 2.0: A time-cost effective alternative to field prospection using Google Street View

Running title: Plant distribution on Google Street View

Authors: Laurent Hardion and Agathe Leriche

Address: Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, UMR CNRS IRD, Aix Marseille Université, 13331 Marseille, France

Corresponding author: laurent.hardion@imbe.fr

Keywords: Occurrence data, Google Street View, *Arundo donax*, species distribution modelling, distribution gap

Abstract: Occurrence data on species distribution represent crucial information for biodiversity studies. Many collections and databases inform about species distribution, but several regions and taxa remains poorly described, even for common taxa in developed countries. To partially resolve the lack of data, we suggested here an original method to improve plant distribution data, using the sizable source of geolocalized photographs freely available in Google Street View. Following a rigorous protocol of virtual prospection, we identified 137 localities of *A. donax* among the Italian Peninsula, but also 161 geographic cells of partial absence. These data were then investigated with two methods of species distribution modeling using presence-only or presence-absence data and bioclimatic predictors. This original and cost-time effective method allows to accurately localize plant taxa and predict their distributions without long and expensive *in situ* prospection. Nevertheless, the use of these visual informations must be restricted to highly distinct taxa occurring in human-disturbed environments as some trees or invasive species. This restriction will be overstepped soon by the expansion of Google Street View in natural habitats.

Journal intended: Plos One

Introduction

Species occurrence data represents basic but indispensable information for research investigations in life sciences (Elith & Leathwick 2009). In addition to guide plant sampling, they allow to define accurate geographic policies in biodiversity conservation (*e.g.* Rondinini *et al.* 2006), to study spatial dynamics and risks of invasive species (Kriticos *et al.* 2013), or to define biogeographic patterns *in silico* based on bioclimatic data (Finnie *et al.* 2007). For twenty years, occurrence data have been increasingly valued with the development of species distribution models (SDMs), and particularly in relation with predictive questions on global changes (Guisan & Thuiller 2005; Elith & Graham 2009). Based on presence/absence or presence-only data, SDMs can predict presence probabilities of a biological object in uninformed areas based on relevant environmental predictors.

Data of plant occurrences are available in various forms. Since the beginning of modern taxonomy, herbarium collections have remained the stronger source for biodiversity localization, associating biological material to geographical occurrence. These data are now digitized and computerised in online database, as JSTOR Global Plants (<http://plants.jstor.org>) or many herbarium websites (*e.g.* MNHN Paris, SONNERAT, <http://coldb.mnhn.fr>). Botanical literature, *e.g.* floras, phytosociology or even naturalist logs also provides many data on plant distribution. At a restricted scale, many national institutions for plant conservation inform about species occurrence on their territory. For example, the 25.000 plant species gathering in the Mediterranean are nationally geolocalised in Spain (www.anthos.es), France (www.silene.eu), Croatia (<http://hirc.botanic.hr/fcd/>), Greece (Fora Hellenica database; Strid 2000) and Palestine (<http://flora.huji.ac.il>). At a broader scale, the international project of Global Biodiversity Information Facility (GBIF, www.gbif.org) gathers freely available distribution data from numerous institutions. The accuracy of these occurrence data is heterogeneous among sources. Data from national institution databases are carefully checked in terms of relevancy of both localisation and taxonomic identification because they are managed by experts, while citizen data or even scientific data loaded in open-access databases are not subject to thorough verification of relevancy and often exhibit errors in species identification or localisation (*e.g.* fine scale localisation of country centroids; Yesson *et al.* 2007).

To collect continuous data on vegetation, indirect methods of photo-interpretation or remote sensing have been developed on aerial photographs in order to characterize large surface of vegetation (*e.g.* Tveraa *et al.* 2013). These methods use spectral signals to define

rough contours of vegetation and habitats, but rarely allow an aerial identification of plant species. More recently however, a lot of horizontal pictures of terrestrial environment have been associated to a vertical perception of worldwide land cover with Google Street View (GSV, freely available on <http://earth.google.com>). Integrated in Google Earth (GE), GSV provides millions of georeferenced panoramas along worldwide roads using car-adapted cameras. To date, only one study has used this free database in biodiversity sciences ("Google Street View" search, <http://webofknowledge.com>). In this latter, the authors successfully identified nesting habitats of two cliff-nesting vultures through virtual prospecting (Olea & Mateo-Tomás 2013). If this first work suggest the scientific usefulness of GSV data, many other applications are still possible from such a worldwide source of information. Indeed, most of these pictures capture information on the environing vegetation. The high quality of photographs even allows identification of many tall plant species by naturalists.

Here we suggest a methodological approach investigating GSV photographs to improve knowledge on plant distribution. We focused on the invasive *Arundo donax* L. (Poaceae) as a suitable biological model due to its ruderal affinities for anthropic environments. The Mediterranean distribution of this species is well-documented by national databases (Fig. 1), but few data inform on its occurrence on the Italian Peninsula, Sicily, Sardinia and Corsica. Using a prospective stratified random protocol, we explored GSV to identify accurate occurrences of *A. donax* among the study area. The usefulness of this kind of data was illustrated through applications in ecology using presence/absence (in GLM algorithm) or presence-only (in MaxEnt algorithm) data to fit SDMs. Advantages, biases and potential perspectives linked to this original mode of virtual prospecting were discussed in order to provide useful guidelines for future application.

Methods

Plant model. The giant cane, *Arundo donax* L. (Poaceae), is a robust grass species native from subtropical Eurasia (Hardion *et al.* 2012). Due to strong rhizomatous growth, this taxon forms dense patches of high culms (up to 6 m) in open landscapes. These sea-green culms possess about 20 alternate and nodding leaves, a plumose panicle and secondary ramifications. Despite some botanical confusions are possible on herbarium specimen (*e.g.* with *Phragmites* sp.), the identification of *A. donax* is easy for shrewd eye and does not require close *in situ* observation. Its ruderal and competitive abilities allow it to invade riverbanks and agricultural margins of many warm regions around the globe (Quinn & Holt 2008). This highly clonal species is only vegetatively dispersed through human activities and

river floods. As a consequence, this species also occur along roads and railways included within its distribution area. Described under highly arid regions, the giant cane is known to be sensitive to cold temperature, reducing its vegetative growth under 17.5°C (Wijte *et al.* 2005). This geophyte plant species also appreciated strong water availability during growing period, explaining its affinities for ripisylves (Quinn & Holt 2008).

Virtual prospection method. The study area included Italian Peninsula, Sicily, Sardinia and Corsica. The objective was the same than when designing a field survey: collecting as much data as possible by allocating the least possible resource. The approach was then to implement a stratified random design for the virtual prospection. Stratification was implemented by removing from the study area regions where it was irrelevant to prospect for *A. donax* occurrences, knowing its ecological preferences. It was done using Koppen–Geiger classification, which classes Earth's climate into zones based on vegetation, precipitation and temperature with class boundaries specifically chosen to match large-scale vegetation changes (Koppen, 1936). We spatially intersected all known Mediterranean distribution records for *A. donax* (3429 records from national databases cited in introduction, reduced to 1 occurrence data per 10 arc-min cell *i.e.* 1221 records) with Koppen–Geiger climate zones provided with the CliMond 10' historical climate data (Kriticos *et al.*, 2011) in order to identify climates under which the species occurs worldwilde. Koppen–Geiger climates exhibiting at least 10 species records (in order to avoid risk linked to outliers or localisation errors) were identified and ecologically checked, and all CliMond polygons outside this list of suitable climates were excluded from the new study area to be prospected (Fig.1).

The remaining area was divided in a random origin grid of 2984 cells of 5 arc-min (*i.e.* 0.1 x 0.1 degree) using ArcGIS 10 (Environmental Sciences Research Institute, Redlands, CA). This resolution level was chosen in accordance with distribution data from others countries. Then, 10% of these cells, *i.e.* 298 cells, were randomly selected, then imported and explored in GE. Virtual prospection was standardised for each cell as a repetitive procedure of the three following steps: (i) West-East and North-South exploration in GE at 1:1x10⁶ scale, looking for suitable zone according to plant ecology (*e.g.* human-disturbed river, farmlands and suburban zones) and including GSV transect; (ii) localisation of potential occurrence at 1:1x10⁵ scale using graphical insights according to plan aspect (*e.g.* sea-green linear or radial patches); (iii) Control of presence/absence using GSV horizontal perception. Cell prospection was stopped when one individual of *A. donax* was robustly identified, or after 5 min of

prospection without identification (hereafter considered as partial absence). This period of time was generally enough to prospect the entire cell. Consequently, partial absences correspond to 10 km side cells, but presence data remain accurate GPS points.

Species distribution modelling, an example of application for GSV data. In order to illustrate the usefulness of presence/absences data from GSV, we use SDM methods to estimate a putative distribution and the ecological niche of *A. donax* according to bioclimatic data. According to biological knowledge on *A. donax* previously mentioned, we chose five bioclimatic variables from BioClim database as predicators of its distribution (www.worldclim.org; Hijmans et al. 2005): minimum temperature of coldest month (BIO6) reflecting potentially lethal frost events, mean temperature of warmest (BIO10) and coldest (BIO11) quarters, delimiting phenological stage for biomass production, precipitations of driest month (BIO14) indicating potentially lethal drought events, and precipitations of warmest quarter (BIO18) informing on water availability during the main period of biomass production.

Two of the most used SDM methods, based on presence/absence or presence-only data, were investigated. (i) Logistic regression is a special generalised linear model using a set of variables to predict a binary dependent variable (*i.e.* here the presence/absence of *A. donax*) with a posterior probability. Using GSV observations (presences/absences in the 10% sampled cells) and the five explicative variables, the best-fitted model was chosen among an exhaustive screening of possible combinations of explicative variables (including pairwise interactions) using `glmulti` R-package and Akaike information criterion (Calcagno & de Mazancourt 2010) in R v.2.15.3 (R Development Core Team 2012). The best-fitted model was then projected to the entire grid to predict occurrence probability on the whole study area. (ii) The maximum entropy method, based on presence-only data, was implemented using MaxEnt software v. 3.3.3 (Philips *et al.* 2008). All combinations of feature types (linear, quadratic, threshold and product) were investigated, using with 50 replicates (cross-validation, training gain threshold of 0.0001) to find the best model. The best model was chosen as the simplest model with the higher area under the curve value (AUC) and the lowest standard deviation among the 50 replicates.

Results and discussion

Among the 298 explored cells, we identified 137 accurate GPS points of *A. donax*, considering the 161 remaining cells in partial absences (Fig. 3a). This dataset highly exceeds

our only six occurrences of *A. donax* known from GBIF and herbarium samples (MARS) before virtual prospection. These new occurrence data position *A. donax* mainly in Central and South Italia and in the three islands, except in altitudes, and despite some exceptions. Nevertheless, some methodological bias could have induced wrong absences. For example, 13 cells among the 161 partial absences are located on coastline and included high proportion of sea surface, decreasing GSV availability. To improve our method before prospection, we suggest to delete all cells with less than a high threshold proportion of emerged land, *i.e.* at least 0.75. Despite difference in data calibration, the two SDM methods highly corroborate in the putative species distribution, with more resolving occurrence probabilities for presence-absence based logistic regression. They describe *A. donax* as a clear thermo- to mesophile species distribution limited by cold temperatures, with very low presence probabilities in the North Italy (*i.e.* Po Valley) and in the Apennines, and higher probabilities toward littoral coasts (Fig. 3b & c). The stepwise selected model for logistic regression explained 50.5% of the deviance and designated mean temperature of coldest (BIO11) and warmest (BIO10) quarters, precipitations of warmest quarter (BIO18), two pairwise interactions among them and two with precipitations of driest month (BIO14) as the best components to predict species occurrence, excluding the minimum temperature of coldest month (BIO6). Linear model was the best model fitted using maximum entropy (test AUC = 0.76, AUC standard deviation = 0.061, gain threshold reached after 180 iterations). Jackknife results performed during the fitting process showed slightly different results than the logistic regression ones: mean temperature of coldest quarters (BIO11), precipitations of warmest quarter (BIO18) were, as with the GLM, the variables with the maximum contribution (54, 29.2 % respectively) in the model while the influence of minimum temperature of coldest month (BIO6), precipitations of driest month (BIO14) and mean temperature of warmest quarter (BIO10) were minimal (8.3, 5.4 and 3% respectively). As an ecological interpretation of the two SDM results, the occurrence of *A. donax* seems highly correlated to mild winters (highest values of BIO11, highly correlated to BIO10 in analyses) and dry summer (lowest values of BIO18), two crucial characteristics defining the Mediterranean climate (Thompson 2005). The absence of distribution limitation by short periods of cold (BIO6) or drought (BIO14) could attest to the buffer power of rhizomatous system against extreme events of environmental stress.

The main advantage of virtual prospection proposed here remains its cost-time optimisation to assess species distribution within a studied area. Theoretically, our parameters define a maximal prospection period of 27 hours (in case of total absence) for the 298

prospected cells, but we actually spent only two working days to collect these data, a lot less than time required to prospect the same cells *in situ*. Even with constraining parameters for prospection, this method remains obviously more time-cost efficient than *in situ* prospection which also requires high missions expenses (*i.e.* travels and accommodations).

Some potential biases could be expected on the ambiguity of botanical identification on photographs. We advise that this method should be applied only for highly recognizable species, such as trees, shrubs or tussock herbs with characteristic shape throughout year. During our virtual prospection, plant identification was only based on the same visual information than during *in situ* identification (*i.e.* 4-6m tall reed; whitish, dressed and plumose panicle; numerous sea-blue decumbent limbs). This intentional restriction excludes uncertain identification, favouring partial absence to false presence. Thus, we are more confident in our occurrence data, verifiable by everyone on GSV (appendix 1), than in many non-supported occurrence from large databases often including false presence (*i.e.* GBIF). Moreover, this study allowed to determine 161 calibration points where *A. donax* can be considered as partially absent. Despite these data cannot attest to complete absence in the whole cell, they are supported by a methodological protocol, in opposition to randomly defined data as pseudo-absence or background data required in all SDM methods (Barbet-Massin *et al.* 2012). Because absence data determined from field 'non-observations' are rarely included into databases, these partial-absences could be very valuable regarding the better efficiency of models based on presence-absence data than presence-only (Elith *et al.* 2006, 2010).

Another bias of GSV data remains their restriction to trunk roads. Despite explored countries generally possess developed road network, these routes mostly occur in lowland and urbanized zones. As a consequence, GSV photographs penalize mountainous and non-ruderal species. However, this geographical restriction was not an inconvenient for ruderal taxa (as *A. donax*) because they are only described from anthropic environments at low to mid-altitudes. This study is limited to GSV predefined linears and do not cover the entire studied zone, but *in situ* prospection is also limited to itineraries of naturalists and rarely cover as many kilometres as the present study.

A lot of utilizations of this original prospection method can be investigated. This study illustrated potential uses in biogeography and ecology, in modelling species distribution and ecological niche without prospection in the wild. However, when *in situ* sampling is required, GSV can be highly useful to maximise success of sampling missions. As an example, we

firstly use this virtual method to pre-localize a third of localities for the overlooked *Arundo plinii s.l.* before to collect it in the wild (Hardion *et al.* 2012). In addition, the present study allows to guide a potential sampling of *A. donax* among all the study area using SDMs on a GSV dataset.

Due to their affinities for human-disturbed areas, alien species are particularly well-suited models for virtual detection on GSV. Indeed, roadsides are often privileged vectors of dispersion for invasive plant taxa (Christen & Matlack 2006). Besides, most of these species possess specific morphology (*i.e.* shape, leaf form, inflorescence) making their identification easy. As examples, we noticed during prospection interesting variations in occurrence of taxa such as tree of heaven (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle), pigfaces (*Carpobrotus* N.E. Br) and Barbary fig (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). Finally, the ecological restriction of GSV to roadsides will be partly removed by its extension in the wild. Indeed, GSV recently presented the trekker, a portable backpack collecting same panoramic photographs along pedestrian paths, and firstly tested along the Arizona's Grand Canyon. This new data collection will allow to many naturalists to virtually prospect a lot of natural landscapes. In this way, localisation of plant species using GSV presents an interesting future for biodiversity studies.

Acknowledgments

The authors thank persons and institutions that provided us occurrence data in the Mediterranean, including Avinoam Danin (Flora of Israel, Israel), Leopoldo M. Domingo (Anthos, Spain), Toni Nikolic (Flora Croatica, Croatia), Virgile Noble (Silene, France) and Arne Strid (Flora Hellenica, Greece).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LH & AL. Performed the experiments: LH. Analyzed the data: LH & AL. Contributed reagents/materials/analysis tools: LH & AL. Wrote the paper: LH & AL.

References

- Barbet-Massin M, Jiguet F, Albert CH, Thuiller W (2012) Selecting pseudo-absences for species distribution models: how, where and how many? *Methods in Ecology and Evolution* 3: 327–338. doi:10.1111/j.2041-210X.2011.00172.
- Calcagno V, de Mazancourt C (2010) glmulti: An R Package for Easy Automated Model Selection with (Generalized) Linear Models. *Journal of Statistical Software* 34. Available: <http://econpapers.repec.org/article/jssjstsof/34i12.html>. Accessed 14 August 2013.
- Christen D, Matlack G (2006) The role of roadsides in plant invasions: a demographic approach. *Conserv Biol* 20: 385–391.
- Elith J, Graham CH (2009) Do they? How do they? WHY do they differ? On finding reasons for differing performances of species distribution models. *Ecography* 32: 66–77. doi:10.1111/j.1600-0587.2008.05505.
- Elith J, Kearney M, Phillips S (2010) The art of modelling range-shifting species. *Methods in Ecology and Evolution* 1: 330–342. doi:10.1111/j.2041-210X.2010.00036.
- Elith J, Leathwick JR (2009) Species Distribution Models: Ecological Explanation and Prediction Across Space and Time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 677–697. doi:10.1146/annurev.ecolsys.110308.120159.
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudík M, Ferrier S, et al. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129–151. doi:10.1111/j.2006.0906-7590.04596.
- Finnie TJR, Preston CD, Hill MO, Uotila P, Crawley MJ (2007) Floristic elements in European vascular plants: an analysis based on Atlas Florae Europaeae. *Journal of Biogeography* 34: 1848–1872. doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01750.
- Guisan A, Thuiller W (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters* 8: 993–1009. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00792.
- Hardion L, Verlaque R, Baumel A, Juin M, Vila B (2012) Revised systematics of Mediterranean *Arundo* (Poaceae) based on AFLP fingerprints and morphology. *Taxon* 61: 1217–1226.
- Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F (2006) World Map of the Koppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* 15: 259–263. doi:10.1127/0941-2948/2006/0130.
- Kriticos DJ, Leriche A, Palmer DJ, Cook DC, Brockerhoff EG, et al. (2013) Linking Climate Suitability, Spread Rates and Host-Impact When Estimating the Potential Costs of Invasive Pests. *PLoS ONE* 8: e54861. doi:10.1371/journal.pone.0054861.
- Kriticos DJ, Webber BL, Leriche A, Ota N, Macadam I, et al. (2012) CliMond: global high-resolution historical and future scenario climate surfaces for bioclimatic modelling. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 53–64. doi:10.1111/j.2041-210X.2011.00134.

Olea PP, Mateo-Tomás P (2013) Assessing Species Habitat Using Google Street View: A Case Study of Cliff-Nesting Vultures. PLoS ONE 8: e54582. doi:10.1371/journal.pone.0054582.

Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. Ecography 31: 161–175. doi:10.1111/j.0906-7590.2008.5203.

Quinn LD, Holt JS (2008) Ecological correlates of invasion by *Arundo donax* in three southern California riparian habitats. Biol Invasions 10: 591–601. doi:10.1007/s10530-007-9155-4.

R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available: URL <http://www.R-project.org/>.

Rondinini C, Wilson KA, Boitani L, Grantham H, Possingham HP (2006) Tradeoffs of different types of species occurrence data for use in systematic conservation planning. Ecology Letters 9: 1136–1145. doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00970.

Strid A (2000) The Flora Hellenica database. Portugaliae Acta Biologica 19: 49–59.

Tveraa T, Stien A, Bårdsen B-J, Fauchald P (2013) Population Densities, Vegetation Green-Up, and Plant Productivity: Impacts on Reproductive Success and Juvenile Body Mass in Reindeer. PLoS ONE 8: e56450. doi:10.1371/journal.pone.0056450.

Wijte AHBM, Mizutani T, Motamed ER, Merryfield ML, Miller, et al. (2005) Temperature and Endogenous Factors Cause Seasonal Patterns in Rooting by Stem Fragments of the Invasive Giant Reed, *Arundo donax* (Poaceae). International Journal of Plant Sciences 166: 507–517. doi:10.1086/428915.

Yesson C, Brewer PW, Sutton T, Caithness N, Pahwa JS, et al. (2007) How Global Is the Global Biodiversity Information Facility? PLoS ONE 2: e1124. doi:10.1371/journal.pone.0001124.

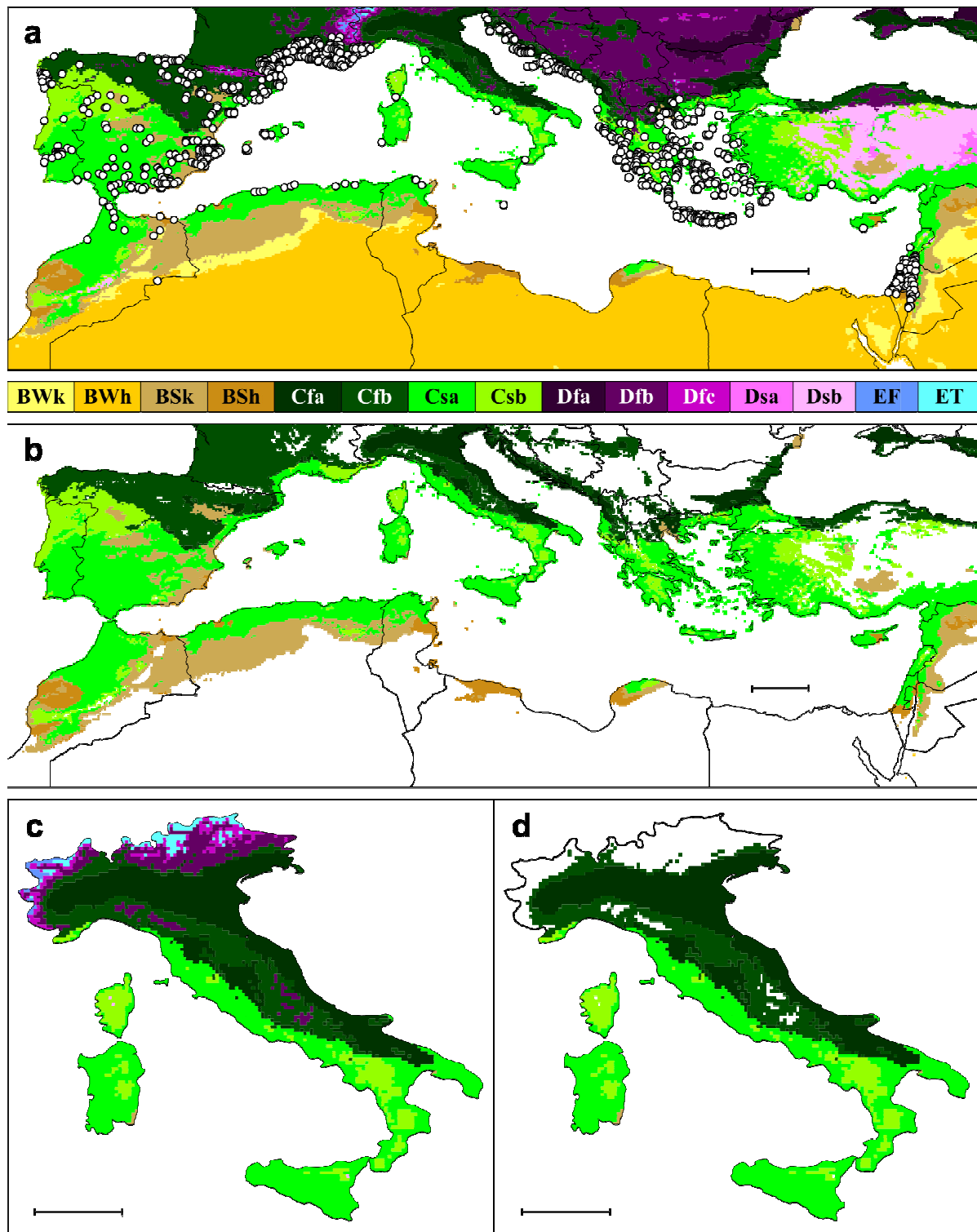


Figure 1. (a) Mediterranean distribution of *A. donax* in Koppen climate zones, using to data from Anthos (Spain), SILENE (France), Flora Croatica Database, Flora of Israel Online and herbarium specimens (MARS); (b) selection of climate zones including most of species distribution, *i.e.* cold- (BSk, 68 occurrences) and hot- (Bsh, 33) arid steppes, warm temperate fully humid zones with hot (Cfa, 141) and warm (Cfb, 177) summers, warm temperate summer dry zones with hot (Csa, 669) and warm (Csb, 111) summers; (c) & (d) Same climate selection focused on studied area. White dot, *A. donax* occurrence. Scale bars = 250 km.



Figure 2. (a) Aerial localisation of a potential occurrence of *A. donax* (green plot) at the cross between a GSV linear (yellow) and a watercourse (blue) on GE; (b) identification of *A. donax* (on the left) using the GSV panorama. Black arrow, orientation of GSV panorama. Scale bar = 100 m.

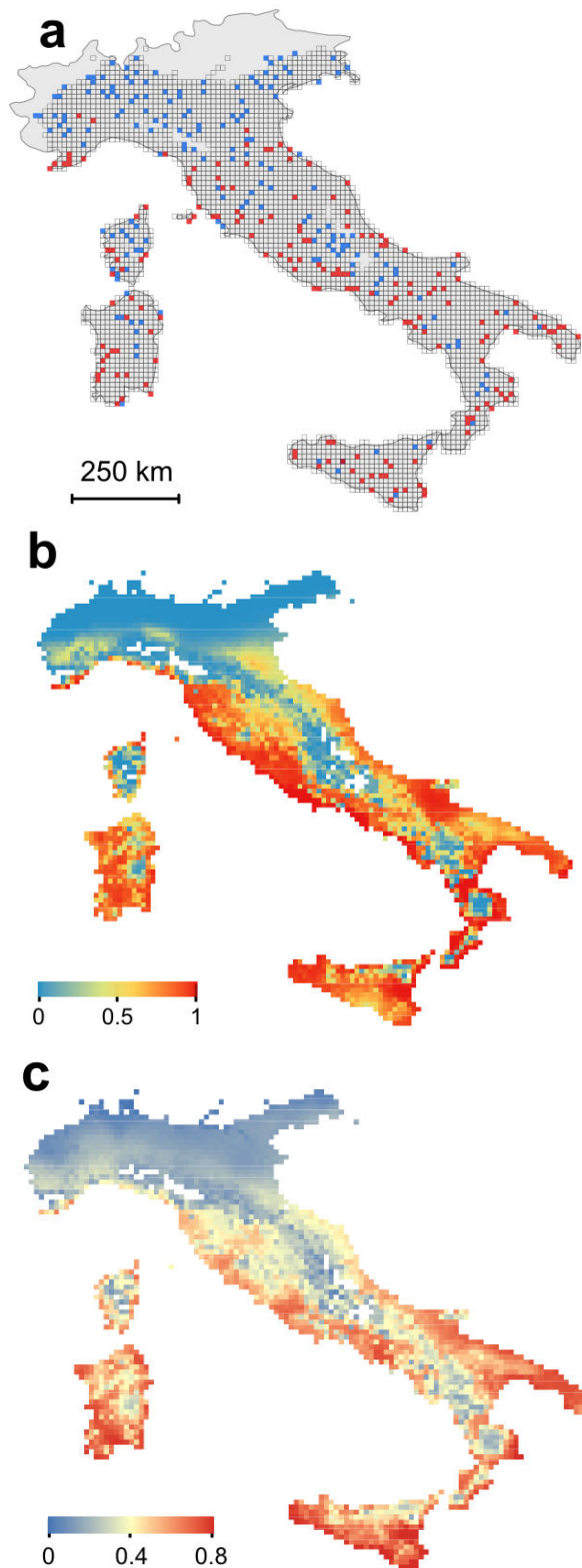


Fig. 3. (a) Presences and partial absences of *A. donax* and species distribution modeling (SDMs) based on posterior probabilities of (b) logistic regression using presences and partial absences and (c) maximum entropy (MaxEnt) using presence-only data.

Manuscrit J

Title: Origin of the invasive *Arundo donax* L. (Poaceae): a trans-Asian expedition in Herbaria

Running title: Origin of *Arundo donax*

Authors: Laurent Hardion¹, Régine Verlaque¹, Kristin Saltonstall², Agathe Leriche¹ and Bruno Vila¹

Address: ¹ Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, UMR CNRS IRD, Aix Marseille Université, 13331 Marseille, France; ² Smithsonian Tropical Research Institute, Apartado 0843-03092, Panama

Corresponding author: Laurent Hardion, Aix Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, UMR CNRS IRD, Aix Marseille Université, 13331 Marseille, France, laurent.hardion@imbe.fr

Abstract: The hypothesis of an ancient introduction, *i.e.* archaeophyte origin, is one of the most challenging questions in phylogeography. *Arundo donax* L. (Poaceae) is considered as one of the worst invasive species around the globe, but also as a useful reed in Eurasia since the Neolithic. Despite the lack of phylogenetic investigations, the literature has often speculated on its introduction in the Mediterranean. Based on 126 herbarium specimens from subtropical Eurasia, this study tested the hypothesis of its ancient introduction from Asia to the Mediterranean using cpDNA mini- and microsatellites. In addition, morphometric and ecological characterizations of Mediterranean localities allowed the search of similar morphotypes and bioclimatic conditions in Asia. Molecular markers attest to the genetic uniformity of *A. donax* from the Mediterranean to the Middle East, with only one haplotype similar to worldwide invasive samples. In opposition, cpDNA data evidenced 13 haplotypes gathered in four geographic clusters, of which a Middle East one including the invasive clone and three other relatives from the Indus Valley. Morphometric data characterized the invasive clone by a robust morphotype distinguishable from other Asian samples, and ecological niche modeling designated S Caspian Sea, S Iran and Indus valley as the most suitable bioclimatic conditions for the invasive clone of *A. donax*. Based on our integrative approach, we hypothesized an antic dispersion of this robust clone from the Middle East to the West, leading to its ancient invasion under the suitable climate of the Mediterranean Basin.

Keywords: *Arundo donax*, invasive species, archaeophyte, herbarium specimens, phylogeography

INTRODUCTION

Human activities have scrambled distribution ranges and dispersal barriers of many organisms, introducing them deliberately (*e.g.* for food, gardening, construction, erosion control) or accidentally around the globe (Elton, 1958; Pysek and Richardson, 2006). Some of them became invasive and form a major threat for global biodiversity in competing with native species for ecosystem resources (Shea and Chesson, 2002). These alien taxa also cause important damages and economic losses on human activities (Pimentel *et al.*, 2005). To control them and reduce their impacts, specific knowledge are needed, regarding their biology and ecology (Dandelot *et al.*, 2005; Blight *et al.*, 2012), but also their genetic and taxonomic delimitations (Saltonstall, 2003; Verlaque *et al.*, 2011) and geographic origin (Lafuma *et al.*, 2003; Verlaque *et al.* 2003). Indeed, the designation of weed origin can be useful, *e.g.* to limit introduction vector, to study the adaptive potential of invasive species in their native area, to lead biological control with parasites regulating this taxon in its native area (Clay, 2003).

Among alien species, literature distinguished archaeophytes, *i.e.* species introduced between the beginning of Neolithic agriculture and the discover of Americas (c. 1500 AD), from neophytes, *i.e.* taxa occurred after 1500 AD (Pysek *et al.*, 2004a). But several archaeophytes became neophytes following secondary introductions, as many alien species transferred from Old to New World (La Sorte and Pysek, 2009). Moreover, ancient introductions often remain a hypothesis to validate by further investigations (Preston *et al.*, 2004). Indeed for many archaeophytes, literature cannot deal with 'native' or 'introduced' status, a position termed 'cryptogenic species' (Carlton, 1996). Thus, the origin of archeophytes is often difficult to find, even using phylogenetic investigations. Nevertheless, literature highlighted several distinctive insights to identify ancient introductions: (i) numerous archaeophytes were introduced with crops translocations, and their affinities to agricultural or human-disturbed habitats are always noticeable despite millennia of occurrence (Pysek *et al.*, 2005); (ii) their ancient presence involves that archaeophytes are generally more widespread than neophytes (Preston *et al.*, 2004; Pysek *et al.*, 2004b). (iii) Alien taxa often contain lower genetic diversity than in their native area due to founder effects and genetic drift following their introduction (Dlugosch and Parker, 2008). However, this pattern may be disrupted by the heterozygosity resulting from recurrent introductions and admixture of invasive populations, or even from hybridization and introgression with native taxa (Baumel *et al.*, 2002; Suehs *et al.*, 2004).

Among worldwide invasive species, *Arundo donax* L. (Poaceae) represent one of the most aggressive plant taxa in subtropical and temperate wetlands. This giant cane is a tall (up to 6 m) perennial grass considered invasive in many warm regions, including Oceania, Africa and Americas (Herrera and Dudley, 2003). Despite *A. donax* has been often described native from subtropical Eurasia, including the Mediterranean Basin, Middle East, N India and E Asia, its accurate origin remains unknown. As an emblematic species of Mediterranean landscapes, this robust reed mainly occurs in human-disturbed habitats, including agrosystems, riparian system and coastal zones. Since Antiquity, this giant cane have been used in a lot of field, *e.g.* constructions, agriculture, weaponry, fishing and hunting, music, erosion control, gardening, medicine and burnable (Perdue, 1958; Vosmer, 2001). After its recent introductions out of Eurasia, *A. donax* has invaded many riparian areas because of its clonal spread by rapid rhizome extension, cutting and flood dispersal (Wijte *et al.*, 2005). In North America, Ahmad *et al.* (2008) reducing 185 putative clones of *A. donax* from Southern USA to only one widespread genotype similar to four populations from Southern France. More recently, Hardion *et al.* (2012) used AFLP fingerprints to show the occurrence of only one clone among 16 localities around the Mediterranean Basin. Besides, seed production was never detected in USA neither in the Mediterranean (Johnson *et al.*, 2006; Hardion *et al.*, 2012). This non-fructiferous character was often attributed to its high polyploid level in these areas ($2n = 18X \sim 108$; Gorenflot *et al.*, 1972; Hardion *et al.*, 2011, 2013) disrupting meiosis steps (Balogh *et al.*, 2012; Hardion *et al.*, 2012). This lack of genetic diversity questions about the native status of *A. donax* in the Mediterranean, and redirect the research of natural populations toward Asia. Using AFLP and ISSR markers on 67 Mediterranean and 10 Asian herbarium specimens, Mariani *et al.* (2010) showed earlier phylogenetic divergence of Asian samples. However, they also highlighted on a non-negligible genetic diversity in the Mediterranean, a result in opposition with Hardion *et al.* (2012). This eastward direction toward phylogenetic origins is also suggested by botanical literature reporting caryopsis occurrence in Iran (Bor, 1970), China and Pakistan (Brach and Song, 2006), and lower cytotypes ($2n = 12X \sim 72$) in Thailand (Larsen, 1963), India (Christopher and Abraham, 1971; Mehra and Kalia, 1975) and Uzbekistan (Bochantseva, 1972). This pattern characterises the whole genus including five species and two ploidy levels, with 12X-cytotypes generally fructiferous *vs.* non-fructiferous 18X (Hardion *et al.*, 2012).

The widespread ruderal distribution of only one non-fructiferous clone leads us to postulate the ancient introduction of *A. donax* in the Mediterranean. The first aim of this study was to test the hypothesis of founder effect linked to this introduction on other highly variable genetic markers. Our second aim was to localize restricted origin(s) for the worldwide invasive genotype of *A. donax*. Finally, we tried to link these previous informations to variations in morphology, polyploidy level, seed production and potential human dispersal. Because this species occurs in problematic countries, our study sampling is mainly based on specimens from European herbaria. In order to extract the most information from these exsiccatae, we set up an integrative approach based on three different markers: (i) phylogenetics, using cpDNA micro-/minisatellites providing more reliable information than AFLPs with equivalent evolution rates; (ii) morphometry, with taxonomic markers allowing to delimit the distribution of robust invasive morphotype on a broader sampling, and stomata length giving an estimation of ploidy level; (iii) ecology, through the modelling of ecological niche of the Mediterranean clone and the search of suitable bioclimatic conditions in Asia.

MATERIAL AND METHODS

Plant collections

The Eurasian sampling of *A. donax* was divided in three inclusive datasets, according to markers used: (i) a restricted number of 57 DNA-preserved specimens suitable for molecular analyses; (ii) a broader collection of 126 exsiccata using in morphometry (Tab. S1; supplementary data); (iii) a large geographical dataset of 3429 occurrences for *A. donax* in the Mediterranean, exported from herbarium specimens and online databases of plant distribution. Seven samples of the Taiwanese endemic *A. formosana* Hack. ($2n = 12X \sim 72$; Hardion *et al.*, 2013), were also analysed for its near relationships with *A. donax* (Hardion *et al.*, 2012). Provided by B, BM, E, G, K, MARS, P and W Herbaria, these valuable specimens were collected since 17th century up to nowadays, in particular by some pioneer botanists in Asia as V. Jacquemont (1757-1836), J.G. König (1728-1785), T. Thomson (1817-1878) and J.S. Gamble (1847-1925). In addition, we also analyze three samples of *A. donax* collected from New Caledonia (Oceania), Peru (South America) and Arizona, US (North America), where this invasive species was introduced during the 20th century.

DNA extraction, sequencing and phylogeographic analysis

DNA extractions were only lead on samples collected after 1930 to avoid useless degradation of ancient specimens and sequencing of highly degraded genome (Telle and Thines, 2008). About 50 mg of leaves were mechanically grinded after a strong cold treatment with liquid nitrogen. Total DNA was extracted following Doyle and Doyle (1987) with slight modifications owing to old herbarium samples: 1.4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8, 4% Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide and 2 h CTAB incubation. After precipitation with 95% ethanol during a night, the centrifuged pellets were washed in 70% ethanol, dried and suspended in TE-buffer with RNase. DNA concentrations were diluted to 50 ng/ μ L using a Biophotometer (Eppendorf, Germany).

Due to low evolution rate in the genus *Arundo*, cpDNA diversity was screened on five intergenic spacers previously designed on *Phragmites* and tested on *Arundo* (Saltonstall, 2001): trnT-trnL (Taberlet *et al.*, 1991), trnCF-rpoB, psaA-ORF170, rbcL-psaI, trnS(GCU)-psbD. Polymerase Chain Reaction (PCR) were performed in 50 μ L volumes containing 2.5 mg DNA, 1 x PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.001% w/v gelatin), 1.5 mM MgCl₂, 2.5 mM each dNTP, 40 pmol of each primer, 0.1 μ g/ μ L Bovine Serum Albumin (BSA) and 2.5 units of *Taq* polymerase (Q-Biogen, Illkirch, France). The thermal cycling profile was programmed on a PTC-200 Gradient Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) as followed: 2 min at 94°C followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 56°C annealing for 1 min, and 72°C for 2 min, followed by a final extension of 72°C for 5 min. Purification and sequencing of PCR products were carried out by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

The five cpDNA sequences were manually aligned in MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Haplotypes relationships were inferred using median-joining network algorithm implemented in Network 4.6 (Bandelt *et al.*, 1999). Insertion/deletions (indels) sites (including repetitive regions as mini- and microsatellites) were reduced, considered as a 5th state and weighted as 1/10 of a substitution. This down-weighting is classically adopted for hyper-variables sites with high homoplasmy probabilities (Saltonstall and Lambertini, 2012). In order to distinguish haplotypes based on substitution patterns from ones supported by hyper-variable sites, the same analysis was also generated without considering indels.

Morphometry

Already used in the taxonomic resolution of Mediterranean *Arundo* (Hardion *et al.*, 2012), 10 morphometric variables were measured on spikelets and leaves: panicle length, culm diameter under the panicle, number of flowers per spikelet, lengths of lower and upper glumes, lemma, palea and lemma apex and long lemma hairs of spikelets collected in the middle part of the panicle, and length and width of the leaf under the panicle. Historically known as highly resolving in grass systematics (Prat, 1932; GPWG, 2001), structures of leaf epidermis could also inform on polyploidy events increasing size of stomata guard cells (*e.g.* in *Phragmites*; Hansen *et al.*, 2007). We estimated the following parameters under light microscopy (Dialux 20, Leitz, Wetzlar, Germany): length of stomata, stomata density and number of rib prickles per μm . In order to avoid degradation of herbarium specimens, leaf epidermis were printed with nail polish following Hilu and Randall (1984), and mounted between slide and cover-slide. All these 15 variables were measured 10 times and averaged for each sample. The occurrence of caryopses was also noted as a qualitative feature. Morphological data were firstly explored with descriptive approaches as principal component analysis (PCA) and UPGMA hierarchical clustering on Euclidian distances using *ade4* package in R v.2.15 (Thioulouse *et al.*, 1997; R Development Core Team, 2013). Few missing values were replaced by variable means.

Ecological niche modelling

As putative origin(s) for the invasive clone, we also modelled its potential distribution in Asia according to the ecological niche of *A. donax* in the Mediterranean. We gathered in ArcGIS 10 (Environmental Sciences Research Institute, Redlands, CA) a combined dataset of Mediterranean occurrences including accurate localities mentioned in MARS herbarium, imported from databases of Mediterranean countries as Croatia (<http://hirc.botanic.hr/fcd/>), France (www.silene.eu), Greece (Fora Hellenica database; Strid, 2000), Palestine (<http://flora.huji.ac.il>) and Spain (www.anthos.es) or determined by virtual prospection of Italy using Google Street View (freely available on <http://earth.google.com>; Hardion and Leriche, *in prep.*). To reduce spatial bias due to differential searching intensities across regions (Segurado *et al.*, 2006), we subsampled this dataset to a grid of 5 arc-min cells (*i.e.* 0.1 x 0.1 degree) with random origin, reducing the dataset from 3429 to 1221 occurrences. According to biological knowledge on *A. donax* previously mentioned, we chose five bioclimatic variables from BioClim database as predictors of its distribution

(www.worldclim.org; Hijmans *et al.*, 2005): minimum temperature of coldest month (BIO6) reflecting potentially lethal frost events, mean temperature of warmest (BIO10) and coldest (BIO11) quarters, delimiting phenological stage for biomass production, precipitations of driest month (BIO14) indicating potentially lethal drought events, and precipitations of warmest quarter (BIO18) informing on water availability during the main period of biomass production.

To model the ecological niche of *A. donax*, we used a machine learning algorithm based on presence-only data and implemented in MaxEnt software v. 3.3.3 (Philips *et al.*, 2008). This method use the principle of maximum entropy to estimate the most uniform distribution within a study area given the constraint that the expected value of each environmental predictor variable under this estimated distribution matches its empirical average (Phillips *et al.*, 2006). Model outputs correspond to posterior probabilities of habitat suitability. All combinations of type features (linear, quadratic, threshold and product) were investigated to find the best model with 50 replicates (cross-validation, training gain threshold of 0.0001). The best model was chosen as the simplest model with the higher area under the curve value (AUC) and the lowest standard deviation among the 50 replicates.

RESULTS

Phylogeographic structure

After indels reduction, the cpDNA alignment of 4518 bp gathered 77 variable sites, *i.e.* 44 substitutions and 33 indels including ten microsatellites, eight minisatellites and three inversions (2, 3 and 5 bp). This dataset distinguishes 13 haplotypes among *A. donax* (Fig. 1a), reduced to 11 after the removal of mini- and microsatellites (Fig. 1b). According to the branching position of other *Arundo* species, '*A. donax*' appears to be polyphyletic divided in two east-west lineages (Fig. 1a and b). Haplotype diversity is divided in four biogeographic clusters differentiated along the Himalayas, *i.e.* Middle-East (including the invasive and Mediterranean haplotype; h = 4; blue), W Himalaya (h = 2; green), C Himalaya (h = 3; yellow) and E Himalaya-China (h = 4; red/pink). In opposition, only one cpDNA haplotype was evidenced on the 28 samples from the Mediterranean and Irano-Touranian regions (Fig. 1c). This widespread haplotype is included in the Middle-East lineage and its nearest relatives are located in Afghanistan and Pakistan (Indus valley). Considering only substitutions, the two E-W lineages divided in four biogeographic clusters are also supported (Fig. 1b). In

addition, the Middle-East cluster was gathered in only one haplotype, indicating that only hyper-variable sites distinguish the Mediterranean clone from its three nearest relatives.

Morphometric differentiation

The UPGMA hierarchical clustering also divided '*A. donax*' in two clusters along a longitudinal gradient (Fig. 1c and d): (i) a Mediterranean and Persian morphotype (T1) with larger morphometric means and poorly ornamented epidermis, restricted to the widespread cpDNA haplotype M1, and (ii) a Sino-Himalayan morphotype (T2) with smaller sizes and highly ornamented epidermis, associated to the four biogeographic cpDNA clusters. This latter is morphologically nearer to *A. formosana* than to T1. Morphotype distribution distinguishes two overlapping zones: one between T1 and T2 in the Middle East (Persia: Iran, Afghanistan and Pakistan), and the other between T2 and *A. formosana* in Taiwan (Fig. 1c). The morphotype T1 possesses almost all the highest stomata sizes (mean value = 38.4 ± 4.3 μm), highly distinguished from the morphotype T2 (29.5 ± 3.8 μm), and *A. formosana* (25.5 ± 2.5 μm) despite some overlapping values of morphotype 2 with morphotype T1 (Fig. 2). Despite 69.7% of samples were collected during the autumn (*i.e.* flowering period), seed occurrence was evidenced for only 12 samples characterised by a morphotype T2, an low cytotype, and located in the Middle-East (SW Iran, Pakistan, Afghanistan) and along the Himalayas (Fig. 1d).

Ecological niche modeling

Based on 1221 occurrences, the ecological niche of *A. donax* in the Mediterranean was modeling with higher importance of BIO10 (mean temperature of warmest quarter), BIO14 (precipitations of driest month) and BIO6 (minimum temperature of coldest month). The more parsimonious model was obtained using linear feature only (test AUC value = 0.90, AUC standard deviation = 0.0065, gain threshold reached after 180 iterations). Projected on Asian bioclimatic data, this model suggested the highest occurrence probabilities (> 0.5) in the south of Caspian Sea, in Southern Iran and along the Indus Valley (Fig. 3).

DISCUSSION

Genetic uniformity in the Mediterranean

Previous phylogenetic studies and written testimonies support a recent introduction of *A. donax* from the Mediterranean to American warm regions (Perdue 1958; Ahmad *et al.* 2008).

But now its native status in the Mediterranean is questioned by its genetic uniformity in this area (Hardion *et al.* 2012). Using cpDNA mini- and microsatellites, the present study also supports the lack of genetic variation of this invasive clone, expanded to the Middle East (Fig. 1c). To date, such an absence of genetic diversity on both chloroplast and nuclear markers was never evidenced for a naturally widespread plant species. Based on equivalent markers and sampling, the nearest plant model is represented by *Pinus pinea* L., exhibiting a Mediterranean-wide haplotype and three locally restricted others (Vendramin *et al.* 2008). Based on a literature review, the authors suggest that such results could be explained by plant clonality, low evolution rates and demographic bottlenecks linked to human-mediated dispersal. Despite low mutation rates and preponderant clonality in the genus *Arundo* (Hardion *et al.* 2012), cpDNA sequences highlighted haplotype variations and phylogeographic structure for Asian *A. donax*. Consequently, human-mediated dispersal remains a prevalent argument to explain the widespread Mediterranean distribution of this non-fructiferous clone. In addition to its repeated introductions, the invasiveness of *A. donax* in warm regions could also explain its spread and persistence all around the Mediterranean. Indeed, such pattern of genetic uniformity are more common for invasive species as *Spartina anglica* C.E. Hubbard and *Pennisetum setaceum* Forsk. Chiov. (Poaceae), linking clonal reproduction, polyploid genome and lack of genetic diversity (Baumel *et al.* 2001; Le Roux *et al.* 2007).

Restricted origin of a worldwide invasive clone

The designation of Afghan and Pakistan samples as the nearest relatives of the invasive haplotype clearly suggests its Middle East origin (Fig. 1). Their phylogenetic affinities are reinforced by the occurrence of genetic variation only on mini-/microsatellites, *i.e.* hyper-variable sites with mutation rate $\sim 10^5$ -fold higher than cpDNA substitution (Cozzolino *et al.* 2003). Contrary to the invasive haplotype, its three most relatives (*i.e.* M2, M3 and M4; fig. 2) exhibit the morphotype T2, and two of them bear seeds. This mismatch between morphometric and phylogenetic clustering could be a consequence of gigantism effect associated to polyploid formation of the invasive clone from fructiferous lower cytotypes, as already evidenced for *A. donaciformis* (Hardion *et al.* 2012). Indeed, stomata sizes seems to highly distinguish the two ploidy levels known for *A. donax* in the literature, only studied to $2n = 18X \sim 108$ in the Mediterranean, and to $2n = 18X \sim 72$ in the Sino-Himalayan region (Fig. 2). This restricted origin is also supported by the absence of the morphotype T1 to the

East and the modelling of suitable bioclimatic conditions for the Mediterranean clone along the Indus Valley (Fig. 3). Despite the lack of genetic data for these localities, the fructiferous morphotypes T2 and the suitable bioclimatic conditions for the Mediterranean clone occurring in SE Iran suggest a larger putative origin. Based on a detailed sampling across Iran, Afghanistan and Pakistan, further studies will be able to identify the nearest fructiferous genotypes from progenitors of the invasive polyploid using chromosome counts and phylogenetic markers as cpDNA mini- and microsatellites or other molecular fingerprints.

One of the oldest invasive species?

Since the Neolithic, the primordial use of reeds by the oldest eastern civilisations (*e.g.* Indus, Persia, Elam, Mesopotamia, Egypt) has been attested in a large panel of fields (Täckholm and Drar 1973; Faiella 2006). Indeed, *Arundo donax* is an easily transplantable and highly productive species offering an exceptional ratio between culm robustness, lightness and flexibility (Perdue 1958). For example, near 2500 BC Sumerian tablets mentioned thousands bundles of reed culms imported from Kurdistan (NW Iran) to S Iraq (Joannes 2001). Numerous plant species have been human-dispersed from SW Asia to the Mediterranean since early Neolithic (Zohary *et al.* 2012). As a consequence, phylogeographic studies on domesticated species often exhibit phylogenetic origin or diversity to the East, mainly from the Levant, *e.g.* Olive tree (N Levant, Besnard *et al.* 2013) and wheat (Kilian *et al.* 2007), but also from the Middle East, *e.g.* grapevine (Caspian region, Arroyo-Garcia *et al.* 2006) or wheat D-genome (*Aegilops tauschii*, NE Iran, Saeidi *et al.* 2008) and Central Asia, *e.g.* domesticated apple (Cornille *et al.* 2012). If the giant cane joins the list of anciently introduced plant species from SW Asia to the Mediterranean, the widely naturalized distribution of its invasive clone may also support one of the oldest plant invasions.

Taxonomic resolution of A. donax

Both cpDNA and morphometric data suggested a taxonomic division of *A. donax* in two east-west clusters despite they differed in cutting suggestion. The cpDNA clustering draws a strong geographical differentiation and equally divides the native distribution of this taxon. In opposition, morphometric data separate a Mediterranean and Persian morphotype T1 to a smaller Sino-Himalayan morphotype T2, also occurring in Iran. Restricted to the invasive haplotype, the robustness of morphotype T1 could be a consequence of human selection of strongest clone to transplant. This artificial selection of most productive genotypes is often

linked to polyploidy (Fitzgerald *et al.* 2012), as suggested here by the estimation of ploidy level (Fig. 2). In consequence, cpDNA and morphometric data could reflect different processes of differentiation leading to speciation. This polymorphism call on the taxonomic resolution of *A. donax*, described from Spain by Linnaeus. Indeed, several *Arundo* taxa were described from N India, *e.g.* *A. bifaria* Retz. and *A. bengalensis* Retz., before to be considered as synonyms of *A. donax* (Hooker 1890). The present paper is not able to resolve the taxonomy of *A. donax*, but an integrative approach based on *in situ* morphometric measures and fresh material should clarify this polymorphism through cytogenetic investigations and molecular fingerprints on nuclear markers.

CONCLUSION

The present study confirms the genetic uniformity of the Mediterranean *A. donax* up to the Middle East supporting its ancient introduction to the west. The phylogeographic structuring of *A. donax* place this invasive clone near to samples from the Indus Valley, where the ecological niche modelling designated suitable conditions for Mediterranean samples. In addition, human selection and dispersion are also supported by the robust but non-fructiferous status of Mediterranean and alien samples, hypothetically linked to its polyploid differentiation. Due to its high invasiveness in warm regions of the globe, this worldwide clone may be one of the oldest biological invasion in the Mediterranean.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank persons and institutions which help us in loan procedure and plant sampling, including T. Haevermans (MNHN Paris, France), L. Gautier and N. Fumeaux (CJB Geneva, Switzerland), M. Vorontsova (RBG Kew, UK), S. Cubey and A. Smith (RBG Edinburgh, UK), R. Prakash (NHM London, UK), E. Vitek (NHM Vienna, Austria), U. Starck and R. Vogt (BGBM Berlin, Germany), H. Engels, C. Constantinou, B. Gambin, F. Abdel-Samad, A. Fridlender, F. Médail (Aix-Marseille University, France), H. Akhiani (Tehran University, Iran), and persons that provided us occurrence data in the Mediterranean, including A. Danin (Flora of Israel, Israel), L.M. Domingo (Anthos, Spain), T. Nikolic (Flora Croatica, Croatia), V. Noble (Silene, France) and A. Strid (Flora Hellenica, Greece).

LITERATURE CITED

- Ahmad R, Liow PS, Spencer DF, Jasieniuk M. 2008.** Molecular evidence for a single genetic clone of invasive *Arundo donax* in the United States. *Aquatic Botany* **88**: 113–120.
- Arroyo-García R, Ruiz-García L, Bolling L, et al. 2006.** Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology* **15**: 3707–3714.
- Balogh E, Herr Jr JM, Czakó M, Márton L. 2012.** Defective development of male and female gametophytes in *Arundo donax* L. (Poaceae). *Biomass and Bioenergy* **45**: 265–269.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 37–48.
- Baumel A, Ainouche M, Kalendar R, Schulman AH. 2002.** Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae). *Molecular Biology and Evolution* **19**: 1218–1227.
- Baumel A, Ainouche ML, Levasseur JE. 2001.** Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). *Molecular Ecology* **10**: 1689–1701.
- Besnard G, Khadari B, Navascués M, et al. 2013.** The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20122833.
- Blight O, Berville L, Vogel V, Hefetz A, Renucci M, Orgeas J, Provost E, Keller L. 2012.** Variation in the level of aggression, chemical and genetic distance among three supercolonies of the Argentine ant in Europe. *Molecular Ecology* **21**: 4106–4121.
- Bochantseva ZP. 1972.** Ochislakh chromosom. *Introd. Akkli. Rasteny Akad. Nauk. UZ. SSR*: 44–53.
- Bor NL. 1970.** Gramineae. In: Rechinger KH. Ed. *Flora Iranica* **70**: 147–244.
- Brach AR, Song H. 2006.** eFloras: new directions for online floras exemplified by the Flora of China Project. *Taxon* **55**: 188–192.
- Carlton JT. 1996.** Biological invasions and cryptogenic species. *Ecology* **77**: 1653–1655.
- Christopher J, Abraham A. 1971.** Studies on the cytology and phylogeny of south Indian grasses: 1. Subfamilies Bambusoideae, Oryzoideae, Arundinoideae and Festucoideae. *Cytologia* **36**: 579–594.
- Clay K. 2003.** Conservation biology: parasites lost. *Nature* **421**: 585–586.
- Cornille A, Gladioux P, Smulders MJ, et al. 2012.** New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS genetics* **8**: e1002703.
- Cozzolino S, Cafasso D, Pellegrino G, Musacchio A, Widmer A. 2003.** Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations

based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Molecular Ecology* **12**: 2783–2792.

Dandelot S, Verlaque R, Dutartre A, Cazaubon A. 2005. Ecological, dynamic and taxonomic problems due to *Ludwigia* (Onagraceae) in France. *Hydrobiologia* **551**: 131–136.

Dlugosch KM, Parker IM. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17**: 431–449.

Doyle J, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.

Elton CS. 1958. The ecology of invasions by animals and plants. 181 pp.

Faiella G. 2005. *The Technology of Mesopotamia*. The Rosen Publishing Group.

Fitzgerald TL, Kazan K, Manners JM. 2012. The Application of Reverse Genetics to Polyploid Plant Species. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**: 181–200.

Gorenflot R, Raicu P, Cartier D. 1972. Caryologie de la canne de Provence (*Arundo donax* L.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris (Sciences Naturelles)* **274**: 391–393.

GPWG-Grass Phylogeny Working Group, Barker NP, Clark LG, Davis JI, et al. 2001. Phylogeny and Subfamilial Classification of the Grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**: 373–457.

Hansen DL, Lambertini C, Jampeetong A, Brix H. 2007. Clone-specific differences in *Phragmites australis*: effects of ploidy level and geographic origin. *Aquatic Botany* **86**: 269–279.

Hardion L, Leriche A. in prep. Plant distribution 2.0: A time-cost effective alternative to field prospection using Google Street View.

Hardion L, Verlaque R, Fridlender A, Vila B. 2013. In: Marhold K. Ed. IAPT/IOPB chromosome data 15. *Taxon* **62**: 1075.

Hardion L, Verlaque R, Baumel A, Juin M, Vila B. 2012. Revised systematics of Mediterranean *Arundo* (Poaceae) based on AFLP fingerprints and morphology. *Taxon* **61**: 1217–1226.

Hardion L, Verlaque R, Fridlender A, Vila B. 2011. IAPT/IOPB chromosome data 11, edited by K. Marhold. *Taxon* **60**: 1221.

Herrera AM, Dudley TL. 2003. Reduction of riparian arthropod abundance and diversity as a consequence of giant reed (*Arundo donax*) invasion. *Biological Invasions* **5**: 167–177.

Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965–1978.

Hilu KW, Randall JL. 1984. Convenient method for studying grass leaf epidermis. *Taxon* **33**: 413–415.

Hooker JD. 1890. *Flora of British India*. L. Kent, UK: Reeve & Compagny.

- Joannès F, Michel C, Bachelot L. 2001.** *Dictionnaire de la civilisation mésopotamienne*. Paris, France: R. Laffont.
- Johnson M, Dudley T, Burns C. 2006.** Seed production in *Arundo donax*. *Cal-IPC News* **14**: 12–13.
- Kilian B, Özkan H, Deusch O, Effgen S, Brandolini A, Kohl J, Martin W, Salamini F. 2007.** Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 217–227.
- Lafuma L, Balkwill K, Imbert E, Verlaque R, Maurice S. 2003.** Ploidy level and origin of the European invasive weed *Senecio inaequidens* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* **243**: 59–72.
- Larsen K. 1963.** Studies in the flora of Thailand 14. Cytological studies in vascular plants of Thailand. *Dansk Botanisk Arkiv* **20**: 211–275.
- Mariani C, Cabrini R, Danin A, Piffanelli P, Fricano A, Gomarasca S, Dicandilo M, Grassi F, Soave C. 2010.** Origin, diffusion and reproduction of the giant reed (*Arundo donax* L.): a promising weedy energy crop. *Annals of Applied Biology* **157**: 191–202.
- Mehra PN, Kalia V. 1975.** In: Löve A. Ed. IOPB chromosome number reports XLIX. *Taxon* **24**: 501–516.
- Perdue RE. 1958.** *Arundo donax*, source of musical reeds and industrial cellulose. *Economic Botany* **12**: 368–404.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. 2006.** Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* **190**: 231–259.
- Phillips SJ, Dudík M. 2008.** Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* **31**: 161–175.
- Pimentel D, Zuniga R, Morrison D. 2005.** Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* **52**: 273–288.
- Prat H. 1932.** L'épiderme des Graminées. Etude anatomique et systématique. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique* **14**: 117–324.
- Preston CD. 2009.** The terms “native” and “alien” -- a biogeographical perspective. *Progress in Human Geography* **33**: 702–711.
- Pyšek P, Jarošík V, Chytrý M, Kropáč Z, Tichý L, Wild J. 2005.** Alien plants in temperate weed communities: prehistoric and recent invaders occupy different habitats. *Ecology* **86**: 772–785.
- Pyšek P, Richardson DM. 2006.** The biogeography of naturalization in alien plants. *Journal of Biogeography* **33**: 2040–2050.
- Pyšek P, Richardson DM, Rejmánek M, Webster GL, Williamson M, Kirschner J. 2004a.** Alien plants in checklists and floras: towards better communication between taxonomists and ecologists. *Taxon* **53**: 131–143.

- Pyšek P, Richardson DM, Williamson M. 2004b.** Predicting and explaining plant invasions through analysis of source area floras: some critical considerations. *Diversity and Distributions* **10**: 179–187.
- Le Roux JJ, Wiczorek AM, Wright MG, Tran CT. 2007.** Super-Genotype: global monoclonality defies the odds of Nature. *PLoS ONE* **2**: e590.
- Saeidi H, Rahiminejad MR, Heslop-Harrison JS. 2008.** Retroelement insertional polymorphisms, diversity and phylogeography within diploid, D-genome *Aegilops tauschii* (Triticeae, Poaceae) sub-taxa in Iran. *Annals of Botany* **101**: 855–861.
- Saltonstall K. 2001.** A set of primers for amplification of noncoding regions of chloroplast DNA in the grasses. *Molecular Ecology Notes* **1**: 76–78.
- Saltonstall, K. 2003.** Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. *Molecular Ecology*, **12**, 1689-1702.
- Saltonstall K, Lambertini C. 2012.** The value of repetitive sequences in chloroplast DNA for phylogeographic inference: A comment on Vachon and Freeland 2011. *Molecular Ecology Resources* **12**: 581–585.
- Segurado P, Araújo MB, Kunin WE. 2006.** Consequences of spatial autocorrelation for niche-based models. *Journal of Applied Ecology* **43**: 433–444.
- Shea K, Chesson P. 2002.** Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **17**: 170–176.
- Sorte FAL, Pyšek P. 2009.** Extra-regional residence time as a correlate of plant invasiveness: European archaeophytes in North America. *Ecology* **90**: 2589–2597.
- Strid A. 2001.** The Flora Hellenica Database. *Portugaliae Acta Biologica* **19**: 49–59.
- Suehs CM, Affre L, Médail F. 2004.** Invasion dynamics of two alien *Carpobrotus* (Aizoaceae) taxa on a Mediterranean island: II. Reproductive strategies. *Heredity* **92**: 550–556.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105–1109.
- Tackholm V, Drar M. 1973.** *Flora of Egypt. vol. II.* Koenigstein, Germany: Otto Koeltz Antiquariat.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- R Development Core Team, 2013.** *R Project for Statistical Computing.* Vienna, Austria.
- Telle S, Thines M. 2008.** Amplification of *cox2* (~620 bp) from 2 mg of up to 129 years old herbarium specimens, comparing 19 extraction methods and 15 polymerases. *PLoS ONE* **3**: e3584.
- Thioulouse J, Chessel D, Dole´dec S, Olivier J-M. 1997.** ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* **7**: 75–83.

Vendramin GG, Fady B, González-Martínez SC, Hu FS, Scotti I, Sebastiani F, Soto Á, Petit RJ. 2008. Genetically depauperate but widespread: the case of an emblematic Mediterranean pine. *Evolution* **62**: 680–688.

Verlaque R, Affre L, Diadema K, Suehs CM, Médail F. 2011. Unexpected morphological and karyological changes in invasive *Carpobrotus* (Aizoaceae) in Provence (SE France) compared to native South African species. *Comptes Rendus Biologies* **334**: 311–319.

Verlaque M., Durand C., Huisman J., Boudouresque C-F., Le Parco Y. 2003. On the identity and origin of the Mediterranean invasive *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). *European Journal of Phycology* **38**: 325–339.

Wijte AHBM, Mizutani T, Motamed ER, Merryfield ML, Miller, Alexander DE. 2005. Temperature and endogenous factors cause seasonal patterns in rooting by stem fragments of the invasive Giant Reed, *Arundo donax* (Poaceae). *International Journal of Plant Sciences* **166**: 507–517.

Zohary D, Hopf M, Weiss E. 2012. *Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of domesticated plants in southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin.* Oxford, UK: Oxford University Press.

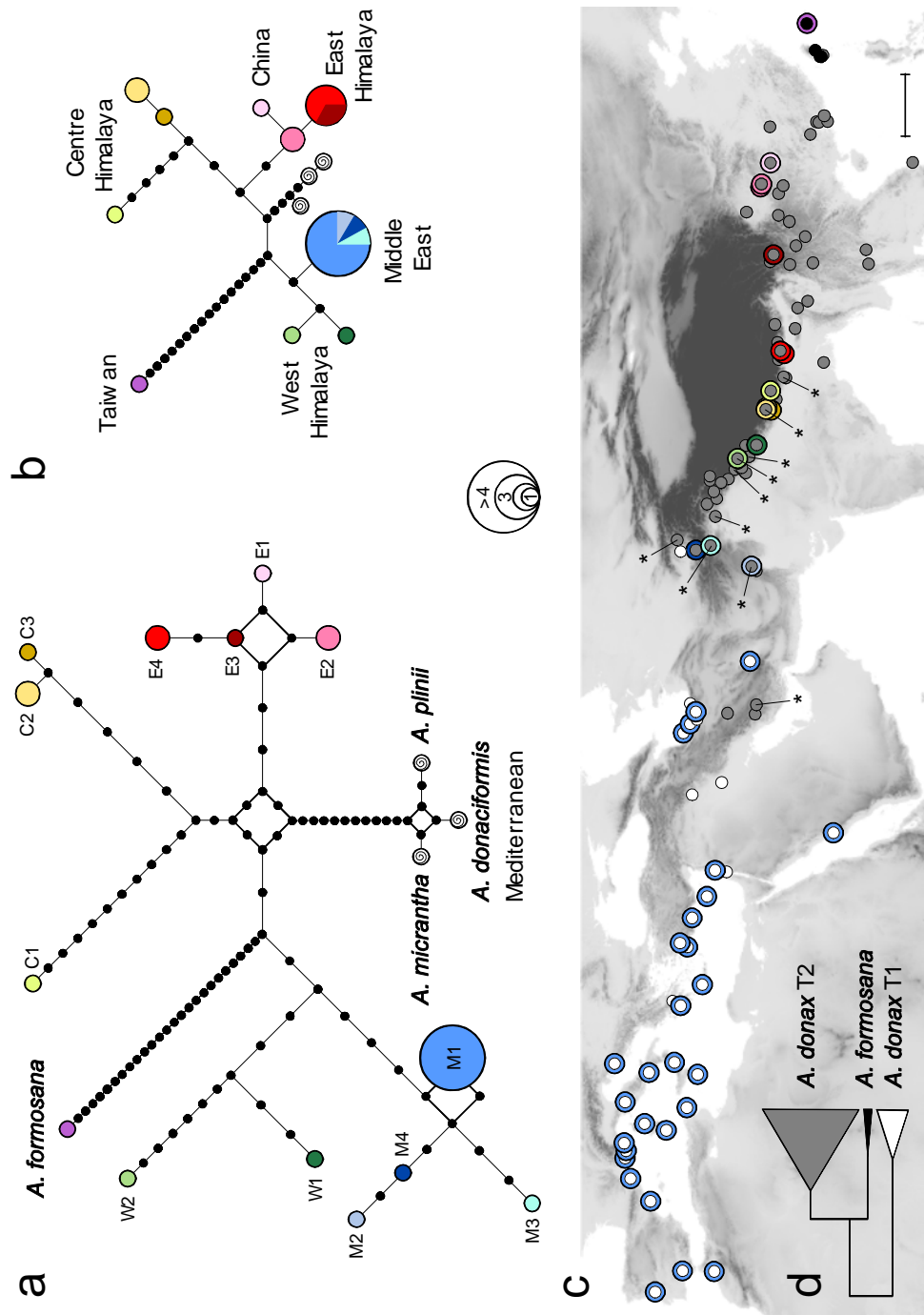


Figure 1. (a) cpDNA network based on substitutions and mini/microsatellites, or (b) on substitutions only, and (c) geographical distribution of cpDNA haplotypes and morphotypes. White symbols, *A. donax* morphotype T1; grey, *A. donax* morphotype T2; black, *A. formosana* morphotype; scale bar = 500km. M1 also includes invasive samples from New Caledonia, Peru and US.

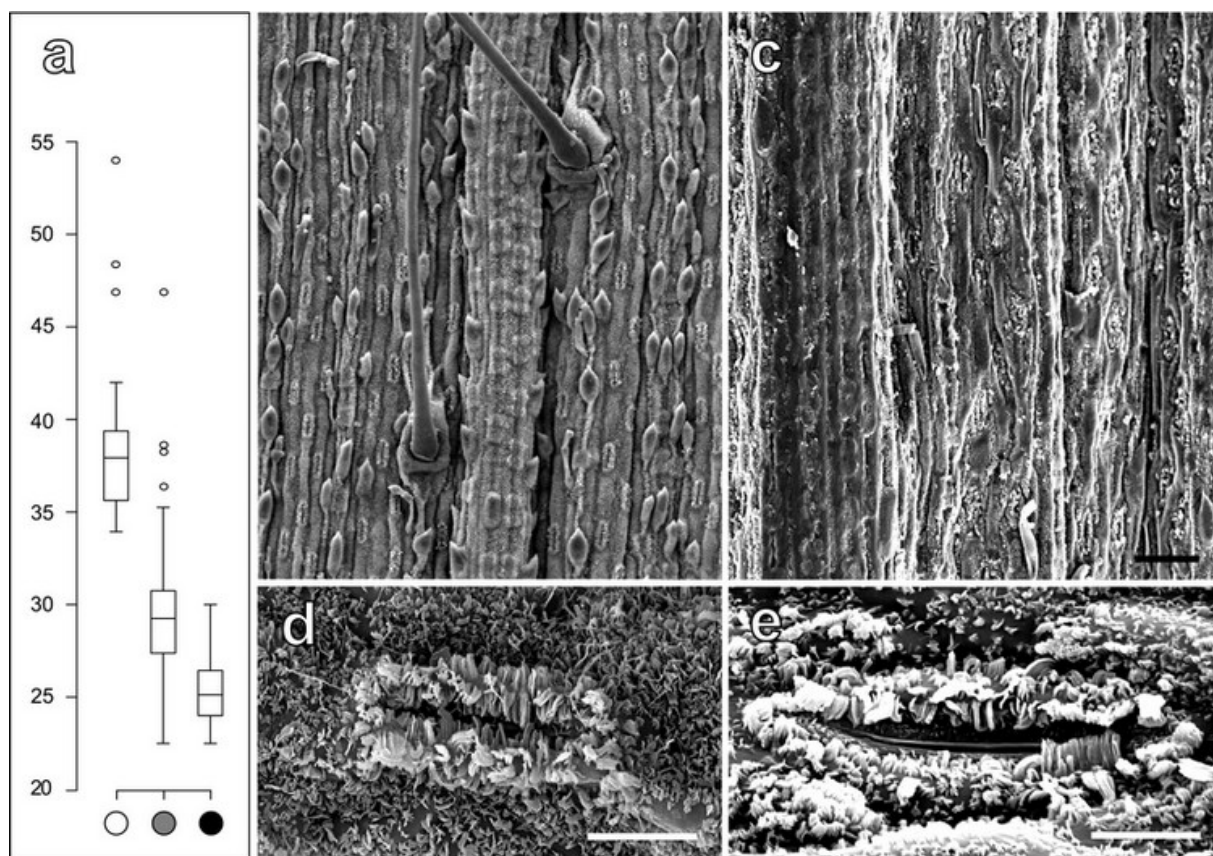


Figure 2. Variation in stomata sizes and SEM micrographies of abaxial epidermis and stomata of *A. donax* morphotype 1 (White plot; a and b, MDo1), *A. donax* morphotype 2 (Grey plot; c and e, Edo6) and *A. formosana* (black plot). Black scale bar, 50μm; white scale bar, 5μm.

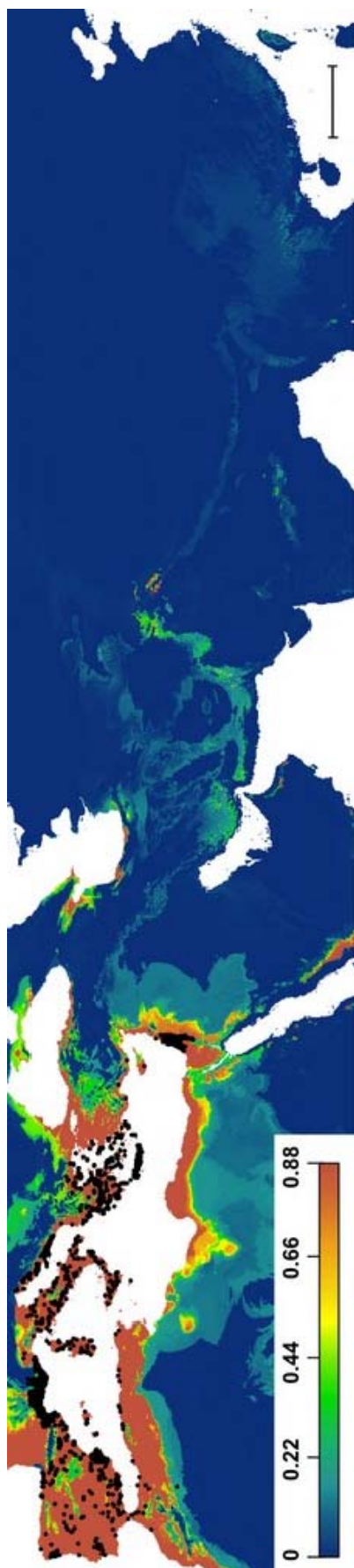


Figure 3. Ecological niche modelling of *A. donax* calibrated on 1221 Mediterranean occurrences (black dots) and projected on subtropical Eurasia using MaxEnt. Scale bar = 500 km.

Supplementary data

Table S1. Information on plant sampling, herbarium specimens, genetic and morphometric data. H, haplotype; M, morphotype; C, caryopses occurrence.

| Locality | Date | Collector | Herb. code | H | M | C | Code |
|--|------------|--------------------|------------|----|----|---|-------|
| A. donax | | | | | | | |
| Bhuin Kulu, Himachal, India, 31.88°N, 77.15°E | 25.10.1916 | Cooper 5770 | B100474948 | - | T2 | x | BDo1 |
| Shapour river, Farsistan, Iran, 29.75°N, 51.55°E | 10.12.1892 | Bornmuller 4848 | B100474949 | - | T2 | - | BDo2 |
| Kulob, Khatlon, Tajikistan, 37.9°N, 69.77°E | 22.10.1881 | Regel 1250 | B100474947 | - | T2 | - | BDo3 |
| Karaj, Alborz, Iran, 35.83°N, 51°E | 18.10.1937 | Gaubas s.n. | B100474946 | - | T1 | - | BDo4 |
| Bafa, Mugla, Turkey, 37.47°N, 27.45°E | 1.10.1989 | Raus 14598 | B100474937 | - | T1 | - | BDo6 |
| Mont Carmel, Palestine, 32.73°N, 35.05°E | 12.10.1951 | Zohary s.n. | B100474938 | - | T1 | - | BDo7 |
| Barfurush, Iran, 36.55°N, 52.68°E | 7.1909 | Bruns s.n. | B100474950 | - | T1 | - | BDo8 |
| Kulob, Tajikistan, 37.9°N, 69.77°E | 1881 | - | B100474944 | - | T2 | - | BDo9 |
| Songtaoxian, Guizhou, China, 28.15°N, 109.2°E | 5.10.1986 | Guizhou exp. 2077 | BM0949275 | E1 | T2 | - | BMD01 |
| Punjab, India, 30.73°N, 76.78°E | - | Thomson s.n. | BM0949267 | - | T2 | - | BMD10 |
| Nanchuan, Chongqing, China, 29.1°N, 107°E | 10.3.1996 | Zheng-yu 15306 | BM0949277 | E2 | T2 | - | BMD11 |
| Khyrna, Kumaon, India, 29.6°N, 79.7°E | 2.10.1985 | Duthie 5102 | BM0949274 | W1 | T2 | - | BMD12 |
| Koti, Punjab, India, 31.15°N, 77.33°E | 26.10.1936 | Koelz 10213 | BM0949262 | - | T2 | - | BMD13 |
| Chumba, India, 27.67°N, 92.3°E | 2.10.1874 | Clarke 24107B | BM0949268 | - | T2 | - | BMD03 |
| Nepal, 27.75°N, 85.27°E | 1820 | Wallich 5018A | BM0949265 | - | T2 | - | BMD05 |
| Shillong, India, 25.57°N, 91.88°E | 2.10.1885 | Clarke 40605B | BM0949264 | - | T2 | - | BMD06 |
| Bhuiji Khola, Nepal, 28.27°N, 83.6°E | 16.10.1954 | Stainton 9061 | BM0949271 | C2 | T2 | - | BMD07 |
| Hue Me Kami, Thailand, 18.15°N, 100.13°E | 17.2.1921 | Kerr 4659 | BM0949261 | - | T2 | - | BMD08 |
| Chiand Mai, Thailand, 17.88°N, 98.65°E | 27.11.1920 | Kerr 4854 | BM0949260 | - | T2 | - | BMD09 |
| Kabadian, Tajikistan, 37.48°N, 68.57°E | 27.9.1929 | Vvedensky s.n. | E00576383 | - | T1 | - | EDo0 |
| Kangfang, Kachin, Myanmar, 26.13°N, 98.58°E | 13.10.1998 | Li 10360 | E00248124 | - | T2 | - | EDo1 |
| Thulo Syabru, Rasuwa, Nepal, 28.13°N, 85.37°E | 11.10.2001 | RBGE exp. 344 | E00210089 | C1 | T2 | - | EDo10 |
| Kokang, Katha, Myanmar, 23.7°N, 98.75°E | 10.11.1911 | Lace 5530 | E00576427 | - | T2 | - | EDo11 |
| Chamba, India, 32.55°N, 76.13°E | 4.9.1896 | Lace 1488 | E00576425 | - | T2 | - | EDo12 |
| Jeedong, Bashahr, India, 31.52°N, 77.8°E | 31.8.1890 | Lace 592 | E00576429 | - | T2 | - | EDo13 |
| Chukha, Chukha, Bhutan, 27°N, 89.5°E | 12.10.1988 | Wood 6809 | E00576420 | E4 | T2 | - | EDo14 |
| Nanchuan, Chongqing, China, 29.1°N, 107°E | 10.3.1996 | Zheng-yu 15306 | E00088095 | - | T2 | - | EDo2 |
| Dora, Baghdad, Iraq, 33.25°N, 44.4°E | 19.2.1960 | Haines 1610 | E00357020 | - | T1 | - | EDo20 |
| Jiddah, Mecca, Saudi Arabia, 21.55°N, 39.17°E | 28.10.1983 | Collenette 4663 | E00357011 | M1 | T1 | - | EDo3 |
| Ortakent, Mugla, Turkey, 37.07°N, 27.33°E | 20.4.1984 | Sorger 84116 | E00294046 | M1 | T1 | - | EDo5 |
| Dêqên, Yunnan, China, 27.83°N, 99.6°E | 30.9.1995 | RBGE exp. 459 | E00051204 | E3 | T2 | - | EDo6 |
| Lin, Guangdong, China, 23.33°N, 113.5°E | 25.10.1918 | Levine 3206 | E00576385 | - | T2 | - | EDo7 |
| Long-Ky, Yunnan, China, 24.5°N, 101.5°E | - | Maire 58 | E00576386 | - | T2 | - | EDo8 |
| Chimakothi, Chukha, Bhutan, 27.1°N, 89.55°E | 24.9.1998 | Noltie et al. 319 | E00166607 | E4 | T2 | - | EDo9 |
| Kairabad, Attock, Pakistan, 33.9°N, 72.23°E | 15.1956 | Stewart s.n. | G00163765 | - | T2 | x | GDo10 |
| Dhaulti Valley, Kumoan, India, 30.57°N, 79.58°E | 22.9.1821 | Duthié 3561 | G00163764 | - | T2 | - | GDo8 |
| Guangzhou, Guangdong, China, 23°N, 113.5°E | 12.1860 | Hance 5501 | K-H1283201 | - | T2 | - | KDo2 |
| Schahpur, Farsistan, Iran, 29.62°N, 52.53°E | 10.12.1892 | Bornmuller 4848 | K-H1283203 | - | T2 | - | KDo1 |
| Kabul, Afghanistan, 34.53°N, 69.17°E | 19.5.1971 | Gibbons 302 | K-H1283204 | M3 | T2 | x | KDo3 |
| Puli Khumri, Afghanistan, 35.95°N, 68.7°E | 6.11.1939 | Koelz 14156 | K-H1283205 | M4 | T2 | - | KDo4 |
| Afghanistan, 34.53°N, 69.13°E | - | Griffith 275 | K-H1283206 | - | T2 | x | KDo5 |
| Nanchuan, Chongqing, China, 29.1°N, 107°E | 10.3.1996 | Zheng-yu 15306 | K-H1283207 | E2 | T2 | - | KDo6 |
| Kashmir, India, 34.5°N, 76°E | 15.11.1848 | Thomson 2006 | K-H1283228 | - | T2 | - | KDo10 |
| Calcutta, India, 22.57°N, 88.33°E | 8.2.1884 | Clarke 34523 | K-H1283227 | - | T2 | - | KDo11 |
| Mantargath, Garhwal, India, 30.38°N, 78.48°E | 10.1898 | Gamble 27353 | K-H1283226 | - | T2 | - | KDo12 |
| Mantargath, Garhwal, India, 30.38°N, 78.48°E | 4.1898 | Gamble 26631 | K-H1283225 | - | T2 | - | KDo13 |
| Thangi, Bushahr, Simla, India, 31.57°N, 78.43°E | 14.9.1934 | Parmanand 1227 | K-H1283224 | W2 | T2 | - | KDo14 |
| Nepal, 26.53°N, 86.73°E | 23.11.1948 | Janaki 1490 | K-H1283222 | - | T2 | - | KDo16 |
| Nepal, 26.53°N, 86.73°E | - | Thomson s.n. | K-H1283221 | - | T2 | x | KDo17 |
| Bhyundar, Garhwal, India, 30.73°N, 79.65°E | 15.10.1962 | Bhattacharyya s.n. | K-H1283213 | - | T2 | - | KDo18 |
| Butley vallKinnaur, India, 31.58°N, 78.42°E | 13.8.1847 | Thomson s.n. | K-H1283215 | - | T2 | - | KDo19 |
| Kinnaur, India, 31.58°N, 78.42°E | 1830 | Jacquemont 1911 | K-H1283214 | - | T2 | - | KDo20 |
| Kaghan, Pakistan, 34.78°N, 73.53°E | 24.8.1896 | Inayat 20303 | K-H1283217 | - | T2 | - | KDo22 |
| Lingehan, Sikkim, Nepal, 27.33°N, 88.62°E | 21.10.1875 | Clarke 25470 | K-H1283219 | - | T2 | - | KDo23 |
| Karong, Manipur, India, 25.3°N, 94.03°E | 9.1950 | Koelz 3891 | K-H1283216 | - | T2 | - | KDo24 |
| Mei Che, Guizhou, China, 26.83°N, 106.83°E | 5.11.1931 | Steward et al. 932 | K-H1283210 | - | T2 | - | KDo25 |

V Origine des clones d'*A. donax* et *A. micrantha* vers l'Asie : manuscrit J

| | | | | | | | |
|---|------------|--------------------------------|------------|----|----|---|-------|
| Baluchistan, Pakistan, 30.12°N, 67.02°E | 16.6.1962 | <i>Stewart 649</i> | K-H1283212 | M2 | T2 | - | KDo26 |
| Baluchistan, Pakistan, 30.12°N, 67.02°E | 1867 | <i>Johan 1113</i> | K-H1283218 | - | T2 | - | KDo27 |
| Kishtwar, Kashmir, India, 33.3°N, 75.75°E | 18.9.1876 | <i>Gamble 31392</i> | K-H1283211 | - | T2 | - | KDo28 |
| Yunnansen, Yunnan, China, 25.48°N, 100.55°E | 11.1906 | <i>Maire 2020</i> | K-H1283208 | - | T2 | - | KDo29 |
| Bhuji Khola, Baglung, Nepal, 28.27°N, 83.6°E | 16.10.1954 | <i>Stainton 9061</i> | K-H1283231 | C2 | T2 | - | KDo7 |
| Kali Gandaki, Myagdi, Nepal, 28.33°N, 83.57°E | 16.11.1986 | <i>Miller 209</i> | K-H1283230 | C3 | T2 | - | KDo8 |
| Chitawan, Nepal, 27.55°N, 84.48°E | 11.11.1974 | <i>Soderstrom 2096</i> | K-H1283229 | - | T2 | - | KDo9 |
| Carry le rouet, Var, France, 43.35°N, 5.13°E | 8.8.2009 | <i>Verlaque s.n.</i> | MARS00049 | M1 | T1 | - | MDo1 |
| La Seyne/mer, Var, France, 43.3°N, 5.9°E | 9.10.2011 | <i>Hardion s.n.</i> | MARS03846 | M1 | T1 | - | MDo10 |
| Mesolonghi, Greece, 38.38°N, 21.55°E | 10.4.2011 | <i>Hardion & Vila s.n.</i> | MARS03844 | M1 | T1 | - | MDo11 |
| St Hippolyte, Languedoc, France, 42.8°N, 3.0°E | 31.12.2009 | <i>Hardion s.n.</i> | MARS03845 | M1 | T1 | - | MDo12 |
| Puget, Provence, France, 43.45°N, 6.68°E | 6.10.2009 | <i>Hardion & Vila s.n.</i> | MARS03843 | M1 | T1 | - | MDo13 |
| Finike, Antalya, Turkey, 36.32°N, 30.22°E | 21.3.2010 | <i>Médail s.n.</i> | MARS03842 | M1 | T1 | - | MDo14 |
| San Pietro, Sardinia, Italy, 39.15°N, 8.3°E | 20.2.2013 | <i>Fridlender s.n.</i> | MARS05001 | M1 | T1 | - | MDo15 |
| Pisa, Toscana, Italy, 43.4°N, 11°E | 6.10.2010 | <i>Hardion & Vila s.n.</i> | MARS00052 | M1 | T1 | - | MDo2 |
| Kolimpari, Crete, Greece, 35.53°N, 23.78°E | 12.4.2011 | <i>Vila s.n.</i> | MARS00050 | M1 | T1 | - | MDo3 |
| Sidi bou said, Tunis, Tunisia, 36.87°N, 10.35°E | 10.11.2009 | <i>Hardion s.n.</i> | MARS00061 | M1 | T1 | - | MDo4 |
| Bonares, Andalousia, Spain, 37.35°N, 6.68°W | 26.11.2010 | <i>Hardion s.n.</i> | MARS00059 | M1 | T1 | - | MDo5 |
| Napoli, Campania, Italy, 40.9°N, 14.05°E | 3.11.2010 | <i>Hardion & Vila s.n.</i> | MARS00053 | M1 | T1 | - | MDo6 |
| Kavassilas, Peloponnese, Greece, 38°N, 21.3°E | 10.4.2011 | <i>Hardion & Vila s.n.</i> | MARS00051 | M1 | T1 | - | MDo8 |
| Cannitello, Calabria, Italy, 38.23°N, 15.65°E | 3.6.2011 | <i>Hardion s.n.</i> | MARS00054 | M1 | T1 | - | MDo9 |
| Jadra, Lebanon, 33.63°N, 35.42°E | 13.7.2012 | <i>Abdel Samad s.n.</i> | MARS00055 | M1 | T1 | - | MDoA |
| Bonifacio, Corsica, France, 41.4°N, 9.17°E | 12.2.2012 | <i>Verlaque s.n.</i> | MARS00048 | M1 | T1 | - | MDoB |
| Limassol, Chypre, 34.67°N, 33.03°E | 11.8.2011 | <i>Constantinou s.n.</i> | MARS00046 | M1 | T1 | - | MDoC |
| Pag, Croatia, 44.5°N, 14.93°E | 12.3.2012 | <i>Fridlender s.n.</i> | MARS00047 | M1 | T1 | - | MDoD |
| Amposta, Catalonia, Spain, 40.7°N, 0.6°E | 19.12.2011 | <i>Hardion s.n.</i> | MARS00060 | M1 | T1 | - | MDoE |
| Rabat, Morocco, 34.03°N, 6.73°W | 5.7.2011 | <i>Hardion s.n.</i> | MARS00057 | M1 | T1 | - | MDoK |
| Figueira da foz, Portugal, 40.2°N, 8.9°W | 3.2.2011 | <i>Engels s.n.</i> | MARS00058 | M1 | T1 | - | MDoL |
| Marsaskala, Malta, 35.85°N, 14.57°E | 2.3.2011 | <i>Médail s.n.</i> | MARS00056 | M1 | T1 | - | MDoM |
| Ventanilla Callao, Peru, 11.89°S, 77.13°W | 26.4.2012 | <i>Vila s.n.</i> | MARS03664 | M1 | T1 | - | MDoP |
| Tehran, Tehran, Iran, 35.68°N, 51.42°E | 1.2.2013 | <i>Akhani s.n.</i> | MARS03847 | M1 | T1 | - | TDo1 |
| Kerman, Balochistan, Iran, 30.28°N, 57.08°E | 16.2.2013 | <i>Akhani s.n.</i> | MARS03848 | M1 | T1 | - | TDo2 |
| Gilan, Iran, 37.27°N, 49.58°E | 19.3.2013 | <i>Akhani s.n.</i> | MARS03849 | M1 | T1 | - | TDo3 |
| Rako, Kinnaur, India, 31.78°N, 78.51°E | - | <i>Jacquemont 1911</i> | P02656857 | - | T2 | - | PDo1 |
| Bankinsing, Taiwan, 22.67°N, 120.48°E | 2.1914 | <i>Faurie 137</i> | P02657037 | - | T2 | - | PDo10 |
| Nekou, Yunnan, China, 28.18°N, 98.87°E | 6.5.1839 | <i>Soulié 1534</i> | P02657035 | - | T2 | - | PDo11 |
| Kakkot, Nepal, 28.87°N, 83.3°E | - | <i>Strachey s.n.</i> | P02657030 | - | T2 | x | PDo12 |
| Macao, China, 22.17°N, 113.55°E | 1836 | <i>Galléry s.n.</i> | P02656993 | - | T2 | - | PDo13 |
| Poonch, Kashmir, India, 33.77°N, 74.1°E | - | <i>Jacquemont 1155</i> | P02656994 | - | T2 | - | PDo14 |
| Chao Tung, Yunnan, China, 27.32°N, 103.72°E | 7.1913 | <i>Maire s.n.</i> | P02657016 | - | T2 | - | PDo15 |
| Kashmir, India, 34.5°N, 76.43°E | - | <i>Jacquemont s.n.</i> | P02657002 | - | T2 | - | PDo16 |
| India, 33.32°N, 75.77°E | - | <i>Thomson s.n.</i> | P02657013 | - | T2 | x | PDo17 |
| Pangi, Kinnaur, India, 31.59°N, 78.28°E | - | <i>Jacquemont 2102</i> | P02657007 | - | T2 | x | PDo18 |
| Cho Ganh, Vietnam, 13.28°N, 109.25°E | 11.1922 | <i>Pétélot 1314</i> | P02656854 | - | T2 | - | PDo2 |
| Wah Shui Shan, China, 22.52°N, 114.13°E | 9.1.1933 | <i>Lau 1000</i> | P02656980 | - | T2 | - | PDo3 |
| Pangi, Kinnaur, India, 31.59°N, 78.28°E | - | <i>Jacquemont 2102</i> | P02656991 | - | T2 | x | PDo4 |
| Chindwin, Myanmar, 24.25°N, 94.75°E | 21.1.1921 | <i>Rock 802</i> | P02657024 | - | T2 | - | PDo5 |
| Srinagar, Kashmir, India, 34.08°N, 74.82°E | 11.10.1856 | <i>Thomson 4601</i> | P02657012 | - | T2 | - | PDo6 |
| Ispahan, Iran, 32.63°N, 51.65°E | 1825 | <i>Bélangier 668</i> | P02657048 | - | T2 | - | PDo7 |
| Mosul, Iraq, 36.33°N, 43.13°E | 12.12.1979 | <i>Housain 117</i> | P03242338 | - | T1 | - | PDo8 |
| Chengdu, Sichuan, China, 30.65°N, 104.07°E | 31.10.1908 | <i>Legendre 228</i> | P02657036 | - | T2 | - | PDo9 |
| Noumea, New Caledonia, 22.3°S, 166.44°E | 8.4.1982 | <i>Morat 6830</i> | P02639345 | M1 | T1 | - | PDo19 |
| Tatopani, Dhaulagiri, Nepal, 28.52°N, 83.67°E | 9.10.1970 | <i>Köckeis & Stangl</i> | W01740 | - | T2 | - | WDo1 |
| Bhutan, 27.42°N, 90.43°E | 1837 | <i>Griffith 6603</i> | W8804 | - | T2 | x | WDo10 |
| China, 27.3°N, 106°E | - | <i>Staunton s.n.</i> | W34635 | - | T2 | - | WDo13 |
| Tehri-Garhwal, India, 30.38°N, 78.48°E | 10.1851 | <i>Duthies 2153</i> | W4069 | - | T2 | - | WDo14 |
| Pin-Fa, Guizhou, China, 26.83°N, 106.83°E | 1903 | <i>Cavalerie 1428</i> | W12194 | - | T2 | - | WDo3 |
| Dongchuan, Yunnan, China, 26.18°N, 103.07°E | 11.1910 | <i>Maire 7498B</i> | W38129 | - | T2 | - | WDo4 |
| Dongchuan, Yunnan, China, 26.18°N, 103.07°E | 1910 | <i>Maire 7005B</i> | W38130 | - | T2 | - | WDo5 |
| Waitsap, Guangdong, China, 23.98°N, 112.2°E | 30.11.1933 | <i>Tsang 23312</i> | W8149 | - | T2 | - | WDo6 |
| Changsha, Hunan, China, 28.2°N, 112.97°E | 17.11.1918 | <i>Handel 12773</i> | W14684 | - | T2 | - | WDo8 |
| Tuscon, Arizona, US, 32°13'N, 110°55'E | - | <i>Saltonstall s.n.</i> | - | M1 | T1 | - | USDo1 |

V Origine des clones d'*A. donax* et *A. micrantha* vers l'Asie : manuscrit J

A. formosana

| | | | | | | | |
|---|------------|--------------------|------------|----|----|---|------|
| Shoushan, Taiwan, 22.63°N, 120.27°E | 5.1889 | - | H12/832-34 | - | Fo | - | KFo1 |
| Iriomote, Japan, 24.27°N, 123.87°E | 5.11.1973 | <i>Furuse 4483</i> | H12/832-36 | - | Fo | - | KFo2 |
| Kanpire-no-taki, Japan, 24.35°N, 123.78°E | 7.11.1985 | <i>Nakaike 603</i> | H12/832-35 | Fo | Fo | - | KFo3 |
| Shoushan, Taiwan, 22.63°N, 120.27°E | - | <i>Henry 1153A</i> | H12/832-32 | - | Fo | - | KFo4 |
| Kordensha, Kagi, Taiwan, 23.47°N, 121°E | 17.10.1912 | <i>Price 908</i> | H12/832-33 | - | Fo | - | KFo5 |
| Kanpire-no-taki, Japan, 24.35°N, 123.78°E | 7.11.1985 | <i>Nakaike 603</i> | P00752036 | - | Fo | - | PFo1 |
| Iriomote, Japan, 24.4°N, 123.77°E | 7.11.1958 | <i>Koyama 7402</i> | P00752035 | - | Fo | - | PFo2 |

VI. Discussion générale

Le genre *Arundo* s'est révélé être un excellent modèle pour illustrer les relations anciennes et intriquées entre l'impact de l'Homme et la biodiversité en Méditerranée. De plus, ce genre présente une forte originalité, puisqu'il regroupe des espèces de graminées très grandes et robustes, hautement polyploïdes, et dont l'importante clonalité impose des taux d'évolution lents. Ces caractères singuliers se sont avérés être à la fois des inconvénients, notamment dans nos analyses génétiques, mais aussi des éléments très structurants dans l'histoire passée et récente du genre. Il résulte de l'étude de ce modèle de nombreux sujets de discussion concernant les corrélations positives et négatives entre clonalité, polyploïdie, diversité génétique, fertilité, domestication, invasion et conservation.

VI.1. Liens entre le genre *Arundo* et l'Homme

Malgré son faible nombre d'espèces, le genre *Arundo* illustre la plupart des cas d'impacts anthropiques sur la biodiversité méditerranéenne abordés en introduction. Cette thèse a été initiée afin d'éclaircir le statut taxonomique d'une espèce protégée et fortement menacée par l'urbanisation à Fréjus. Dans ce contexte **d'érosion de la biodiversité**, le modèle *Arundo* a révélé les nombreux problèmes posés par l'absence de réflexion sur la place de la biodiversité indigène en milieu urbain, ainsi que sur la conservation d'espèces de prime abord 'non attrayantes'. La clonalité de l'endémique ligure *A. donaciformis* a constitué le principal handicap pour sa protection, puisqu'elle est responsable de son image d'espèce 'proliférante' vis-à-vis des habitants de Fréjus. De plus, son absence de diversité génétique empêche de proposer des priorités de conservation en terme de potentiel adaptatif. Après avoir démontré son statut d'espèce à part entière et son indigénat, établi son aire restreinte, puis reconstruit le scénario Quaternaire de sa formation (Manuscrit E), l'étude diachronique de sa distribution a illustré l'ancrage historique de son érosion par l'agriculture, puis l'urbanisation (Chap. IV).

L'homogénéisation, la 'domestication', voire la modification de la biodiversité, ont aussi été illustrées par des taxons largement dispersés par l'Homme tout autour de la Méditerranée comme on peut le penser pour *A. micrantha*, ou mondialement pour *A. donax* (Chap. V). En effet, leur transplantation a pour conséquence directe une homogénéisation de la biodiversité méditerranéenne, homogénéisation renforcée par la dispersion d'un seul et même clone de ces deux espèces (Chap. II). Si *A. micrantha* semble juste être naturalisé en différents points du bassin méditerranéen comme en témoigne sa rareté, par contre *A. donax* constitue une réelle espèce envahissante transformatrice d'écosystèmes ('transformers',

Richardson *et al.* 2000). Son invasion dans les milieux humides notamment a pour conséquence directe la réduction de la biodiversité native (Herrera & Dudley 2003). En effet, dans ces zones déjà les plus vulnérables de Méditerranée, ce taxon forme de larges peuplements monospécifiques. L'origine du clone invasif d'*A. donax* retrace une probable sélection de la main de l'Homme, puis une dispersion d'Est en Ouest des individus les plus robustes et polyploïdes originaires du plateau perse entre Tigre et Indus (Chap. V).

Enfin, la révision taxonomique des *Arundo* en Méditerranée, puis les premières perspectives systématiques en Asie peuvent apparaître comme une **inflation taxonomique**, enrichissant ce genre de deux à trois espèces clonales sans diversité génétique. Malgré leur réelle distinction morphologique et phylogénétique, *A. micrantha* et *A. donaciformis* ne sont connus que par un seul génotype chacune (Chap. II), ce qui pourrait être le cas d'*A. donax* si une révision taxonomique n'avait pas permis de distinguer le morphotype 1 invasif du morphotype 2 asiatique (Chap. V). Cependant, le travail taxonomique réalisé durant cette thèse se base sur un faisceau d'éléments confirmant la légitimité de ces espèces.

VI.2. Notion d'espèce clonale et taxonomie intégrative

Comme nous venons de le résumer, le genre *Arundo* s'est enrichi avec cette thèse de deux espèces monoclonales, *A. micrantha* et *A. donaciformis* (Chap. II). Bien que taxonomiquement équivalents, l'uniformité génétique de ces espèces a des causes et des conséquences différentes. Tout d'abord, la polyploidie constitue un argument majeur pour expliquer la forte clonalité d'*A. donaciformis* et d'*A. donax* à $2n = 108$ (voir Discussion VI.3), dont les plus proches parents de ces deux clones ont été identifiés. Ces derniers possèdent une morphologie plus frêle et un niveau de ploïdie plus bas, en outre ils peuvent être fructifères, contrairement à leurs hauts polyploïdes (Chap. III & V). Compte tenu de la forte proximité génétique de leurs proches parents, la formation polyploïde clonale de ces deux morphotypes spécifiques pourrait suffire à expliquer leur absence de diversité génétique. Cependant, ces conclusions ne s'appliquent en rien à l'énigmatique *A. micrantha* qui possède le niveau de polyploïde le plus bas du genre *Arundo*, *i.e.* $2n = 72$. Ce taxon s'avère génétiquement isolé des autres *Arundo* du même complexe *A. plinii* d'après les marqueurs AFLP (Chap. II), malgré son inclusion dans le cluster méditerranéen selon les séquences d'ADNcp (Chap. V). L'absence de diversité génétique et de fructification reste une énigme malgré nos spéculations sur son introduction ancienne et répétée en Méditerranée, ainsi que son hypothétique origine

proche-orientale. Toutefois, la découverte future de génotypes voisins d'*A. micrantha* avec une morphologie et un niveau de polyploïdie similaires, mais fructifères, reste envisageable. Une telle mise en évidence confirmerait le rang taxonomique de cette espèce et renforcerait son statut d'introduite en de nombreux points de la Méditerranée.

Cette situation taxonomique d'espèce indigène monoclonale paraît assez exceptionnelle dans la littérature, mais se retrouve plus souvent chez les taxons clonaux, polyploïdes et dispersés par l'Homme, voire parfois envahissants. Plusieurs espèces natives à aires restreintes ou endémiques montrent des cas similaires à celui d'*A. donaciformis*, comme *Zelkova sicula* (Fineschi *et al.* 2004) ou divers *Limonium* polyploïdes apomictiques (Palacios & Gonzalez-Candelas 1997 ; Baumberger *comm. pers.*). Par contre, des situations semblables à *A. micrantha* ou *A. donax*, *i.e.* espèces « natives » largement distribuées avec une uniformité génétique sont très rares, *Spartina maritima* en constitue cependant un exemple, car cette graminée polyploïde clonale est dispersée sur de longues distances par les courants marins (Yannic *et al.* 2004). L'absence totale de diversité génétique se constate plus fréquemment chez des espèces envahissantes dans leur aire d'introduction, à l'image de *Spartina anglica* (Baumel *et al.* 2001) : graminée clonale allopolyploïde de formation récente et elle aussi à dispersion maritime lointaine, ou encore de la polyploïde *Fallopia japonica* en Grande Bretagne (Hollingsworth & Bailey 2000). Cependant, cette uniformité génétique s'étend même à l'aire d'indigénat dans le cas de *Pennisetum setaceum*, graminée invasive des régions chaudes du globe et originaire du Proche-Orient (basé sur 19 sites microsatellites ; Le Roux *et al.* 2007). La littérature soutient donc d'une part l'hypothèse de la dispersion volontaire des clones non fructifères d'*A. donax* et d'*A. micrantha*, et d'autre part l'existence naturelle possible d'espèces monoclonales, cas rarissimes en taxonomie mais pertinents pour la recherche. Soulignons que la prise en considération d'*A. donax* et d'*A. donaciformis* en temps qu'espèces permet aussi d'étudier l'impact et le suivi de chaque clone, tant en biologie des invasions (*A. donax* ; Chap. V) qu'en biologie de la conservation (*A. donaciformis* ; Chap. IV). En effet, si ces deux clones présentent des similitudes par leur formation polyploïde en marge de l'aire de leurs proches parents, la première espèce est devenue une invasive mondiale parmi les plus agressives, tandis que la seconde demeure endémique de Ligurie. Ce témoin des migrations induites par les glaciations du Quaternaire se trouve aujourd'hui menacé d'extinction.

Bien que le rang choisi puisse être discuté, la différenciation morphologique et biologique de ces clones (niveau de ploïdie, barrière reproductive) mérite donc une distinction taxonomique qui s'appuie en priorité sur la notion d'espèce phénétique et biologique (Mayr 1942), et non phylogénétique (Davis & Nixon 1992). En fait, ces nuances n'ont plus beaucoup d'importance dans la pratique actuelle de la systématique dans l'optique d'un concept unifié de l'espèce et d'une taxonomie intégrative (Queiros 2007). Si de nombreux processus conduisent à la spéciation, ceux présents dans le genre *Arundo* ne peuvent être mis en évidence uniquement par des méthodes phylogénétiques classiques (*e.g.* ADNcp), en fonction de la forte clonalité et des faibles taux d'évolution du genre. De plus, la différenciation polyploïde semble être un processus de spéciation tout aussi prépondérant chez les *Arundo* que la divergence phylogénétique par dispersion ou vicariance. Par chance, la plupart des événements de polyploïdie se reflètent assez fortement sur la morphologie des espèces. Si la morphologie à elle seule nous apprend peu sur l'évolution du genre *Arundo*, la taxonomie intégrative prend ici tout son sens. Cette dernière nous a permis, en utilisant plusieurs outils (morphologie quantitative et qualitative, ADNcp et empreintes AFLP, nombres chromosomiques et quantités d'ADN, enfin modélisation de niche écologique), d'opter pour le scénario taxonomique le plus robuste, mais aussi de nous renseigner sur l'évolution, *i.e.* l'histoire de la formation et de la divergence des taxons. Ces informations, bien que très complexes à associer entre elles, renforcent la pertinence des statuts taxonomiques.

VI.3. Impacts de la polyploïdie dans le genre *Arundo*

Le genre *Arundo* ne comprend actuellement que deux niveaux de polyploïdie, $2n = 12X \sim 72$ et $2n = 18X \sim 108$. Ainsi, le cytotype le plus bas du genre peut être considéré comme dodécaploïde, en fonction du nombre de base le plus probable établi pour cette sous-famille ($X=6$). Cette polyploïdie initiale des *Arundo* concorde avec la présence exclusive de polyploïdes chez les Arundinoideae (Hardion *et al.* 2013). Phylogénétiquement considéré comme le plus proche des *Arundo*, le genre monospécifique *Monachather* se caractérise aussi par $2n = 72$ (sous le synonyme *Danthonia bipartita* Muell.; Brock & Brown 1961). En outre, des événements parallèles de polyploïdie ont conduit à la différenciation morphologique spécifique d'*A. donaciformis* en Méditerranée centrale et d'*A. donax* en Orient (Chap. II & V). Il faut toutefois noter que ces processus ne permettent pas toujours l'acquisition d'une telle différenciation morphologique, comme nous l'avons vu chez *A. plinii*, plus proche parent d'*A. donaciformis*, par l'apparition d'autres hauts niveaux de polyploïdie (Chap. III), ou comme

supposé chez *A. donax* avec la taille des stomates (Chap. V). Si ces événements de polyploïdie augmentent la vigueur végétative et donc la clonalité des individus, ils semblaient aussi corrélés avec l'absence de fructification *in situ*.

Par ailleurs, nos observations en biologie de la reproduction viennent nuancer l'hypothèse de stérilité induite par la polyploïdie (Chap. IV). En effet, l'étude de la microgamétogénèse, puis de la viabilité et de la germination polliniques ne soutiennent pas l'impact négatif direct de la polyploïdie sur la production de caryopses. Ainsi, des graines viables ont été observées chez des individus à $2n = 18X$ d'*A. plinii* et d'*A. donaciformis*, cultivés en mélange de génotypes en jardin botanique. Ces individus présentent d'ailleurs des taux de viabilité pollinique élevés et de germination pollinique non nuls, avec des valeurs faibles mais similaires à celles des individus fructifères d'*A. plinii in situ*. Ces variations dans la production de caryopses entre les conditions naturelles et contrôlées peuvent s'expliquer par des processus non forcément liés à la polyploïdie. Si l'anémophilie et l'auto-incompatibilité constituent des caractéristiques de Poaceae vivaces (Richards 1997), il existe d'autres causes envisageables à cette non fructification. Il s'agit :

- (1) de dégénérescences liées à la culture prolongée (clones âgés de plusieurs millénaires) ;
- (2) de conditions écologiques non propices à la fécondation et/ou à la nouaison (notamment en climat méditerranéen xérique). En effet, la reproduction sexuée est bien souvent tributaire d'un degré hygrométrique correct, pour maintenir une bonne hydratation du pollen et des stigmates (Richards 1997) ;
- (3) d'une évolution à long terme des populations clonales et/ou très denses. Chez les *Rumex*, Escarré *et al.* (1987, 1991) constatent la prédominance des pieds femelles dans les jeunes sites colonisés, et de pieds mâles dans les parcelles plus anciennes : avec le temps il y a une chute de l'effort reproductif. Ils écrivent « La reproduction sexuée représente un coût énergétique élevé qui tend à diminuer la part d'investissement dans la biomasse ». Un phénomène analogue existe chez les *Brachypodium* polyploïdes, *B. retusum* (Pers.) Beauv. ou *B. rupestre* (Host) R. & S. : pieds isolés fructifères et peuplements denses uniquement mâles (Imbert 1992). Les *Arundo* ont d'ailleurs conservé leur floraison automnale (seulement après des pluies abondantes) basée initialement sur les régimes des moussons.

En fait, l'impact de la polyploïdie sur l'ensemble des processus de la reproduction demeure un vaste sujet toujours controversé (Mable 2004). Cependant, *A. micrantha* ($2n = 72$)

et *A. donax* ($2n = 108$) forment du pollen très peu viable qui ne germe jamais. Ces observations préliminaires nécessitent de futures investigations sur l'auto-incompatibilité, la macro-gamétogenèse et les processus de fécondation.

Malgré son uniformité génétique, *A. donax s.str.* colonise de très nombreux habitats à travers le monde, et présente un grand polymorphisme selon les milieux. De même, la plasticité phénotypique du clone invasif mondial *Pennisetum setaceum* est expliquée par son haut niveau de polyploïdie (Poulin *et al.* 2005) ; certains auteurs parlent de 'super-génotype' pour justifier sa vaste distribution (Le Roux *et al.* 2007). Ainsi, la polyploïdie augmenterait la diversité génétique intra-individuelle en fixant une plus forte hétérozygotie des individus concernés. Les patrons d'expression des gènes seraient aussi modifiés, leurs permettant une variation phénotypique plus large que celle de leurs géniteurs (Hegarty & Hiscock 2007). Cette diversité intra-génotype compenserait, dans un second temps, l'absence de reproduction sexuée, et donc de brassage de la diversité inter-individuelle, considérée habituellement nécessaire, voire indispensable au maintien de l'adaptabilité des populations et à l'avenir de l'espèce (Archetti 2004 ; Whitton *et al.* 2008). Il faut toutefois noter que tous les événements de polyploïdie mis en évidence dans le genre *Arundo* ne correspondent pas au scénario classique d'allopolyploïdie, avec le doublement du stock chromosomique (addition des génomes parentaux), suite au non-appariement des chromosomes homologues durant la méiose et à la formation de noyaux de restitution. Ici, il s'agit plutôt de la rencontre d'un gamète réduit avec un non-réduit, *i.e.* le cas classique décrit chez la plupart des autopolyploïdes, notamment en limite d'aire (Bretagnolle & Thompson 1995). Bien qu'elle puisse se produire entre génotypes distincts d'une même espèce, l'autopolyploïdie fixe bien moins d'hétérozygotie que ne le fait un 'hybride' allopolyploïde (Doyle *et al.* 2008). Ces taux d'hétérozygotie pourront être estimés dans le cadre d'une prochaine étude (Discussion VI.5), par l'utilisation de marqueurs microsatellites nucléaires sur un panel d'individus représentatifs issus de notre échantillonnage.

Enfin, la polyploïdie génère un terrain favorable pour la réorganisation structurale des génomes. Ces restructurations du caryotype revêtent de multiples formes, comprenant de très nombreuses recombinaisons/transpositions de fragments d'ADN par l'activité des transposons (Parisod *et al.* 2009, 2010 ; Bureau *et al.* 2010), la mise sous silence ou la sub-fonctionnalisation d'allèles (Adams & Wendel 2005), voire la perte de matériel (Leitch &

Bennett 2004). Durant nos travaux, ces événements n'ont pas pu être mis en évidence par des méthodes génomiques. Cependant, nos observations en microscopie ont révélés des caryotypes asymétriques avec des chromosomes de tailles bien différentes, des centromères souvent sub-terminaux, de très nombreux satellites et parfois des fragments isolés ; ceci traduit des restructurations fréquentes. Par ailleurs la forte aneuploïdie constatée chez *A. plinii* à différents niveaux de polyploïdie confirme la plasticité du caryotype de ces taxons (Chap. III). Encore difficile à interpréter, ces processus d'aneuploïdie jouent un rôle non négligeable dans l'évolution, par la stabilisation des valences instables et la création de nombres de base secondaires. Des événements anciens d'aneuploïdie ont d'ailleurs été mis en évidence chez les Poaceae (Vandepoele *et al.* 2003) et dans maints autres groupes (Lamiaceae, Campanulaceae).

VI.4. Impact des changements climatiques sur le genre *Arundo*

Contrairement aux idées reçues, le climat n'a jamais cessé de changer. Depuis quelques années, les scientifiques (climatologues, géologues, palynologues, archéologues, historiens...) s'accordent pour imputer aux changements climatiques passés les grandes mutations des civilisations antiques (expansion, déplacements ou extinction) de l'Indus à la Méditerranée (Weiss *et al.* 1993 ; Djamili *et al.* 2010; Roberts *et al.* 2011a, b). On peut citer en particulier les fortes modifications des précipitations hivernales entre le milieu (4000 BP) et la fin de l'Holocène (2000 BP) : leur augmentation puis leur déplacement d'Est en Ouest, et enfin leur réduction vers le milieu du premier millénaire avant notre ère (Roberts *et al.* 2011 a, b). La présence actuelle d'*A. plinii* et d'*A. donaciformis*, indigènes dans des zones à bioclimat méditerranéen humide à per-humide de Méditerranéen centrale, concorde assez bien avec ces bouleversements climatiques passés. Ces derniers pourraient aussi expliquer la régression drastique de l'aire naturelle d'*A. micrantha*, sans doute à rechercher de nos jours dans les rares zones humides orientales. Enfin, les éléments de biogéographie apportés par l'étude de l'évolution des *Arundo* montrent la différenciation d'Est en Ouest de ce genre et des similarités entre les bioclimats méditerranéen et subtropical humide du sud-est asiatique (Manuscrit J). Ce patron phylogéographique bien particulier demeure encore peu étudié, or il semble capital pour comprendre l'origine d'une partie de la flore méditerranéenne et notamment son élément sino-himalayen, à l'image du genre emblématique *Olea* (Besnard *et al.* 2009). Ces deux genres originaires du Sud asiatique ont suivi la même migration vers l'Ouest, et ont différencié presque en même temps des taxons strictement méditerranéens, au début de la mise en place du bioclimat méditerranéen.

VII. Perspectives

VII.1. Recherches appliquées : expertise scientifique des transplantations d'*A. donaciformis* à Fréjus

Afin de valoriser nos travaux de conservation en pratique et de dépasser le « going-doing gap » (Knight *et al.* 2008), notre approche pluridisciplinaire nous a permis d'acquérir non seulement les connaissances intrinsèques de l'espèce (*i.e.* biologie, autécologie, génétique), mais aussi celles liées à son environnement (synécologie, géographie-urbanisme, ethnobotanique, sociologie et archéologie). Afin de réduire l'écart souvent constaté entre la recherche théorique et son application pratique en matière de conservation, nous sommes impliqués dans trois chantiers de transplantation et de restauration de stations de canne de Fréjus. De plus, nous participons activement à l'élaboration du plan de conservation concerté, en raison de l'apport de nos connaissances scientifiques.

Suivi de la transplantation expérimentale du bassin écreteur du Castellás.

Une transplantation expérimentale d'*A. donaciformis* depuis le quartier « sensible » de la Gabelle au bassin écreteur du Castellás a été accordée à la CAFSR en 2008. Elle a conduit à l'élaboration d'un protocole de transplantation par la CAFSR, amendé par l'IMBE puis à la transplantation. Les transplants ont été prélevés selon trois modalités de 125 touffes chacun :

- en mottes : touffes extraites avec leur rhizosphère (Figure 25A).
- en amas de rhizomes : réseau de rhizomes enchevêtrés (Figure 25B);
- en rhizomes nus : segments individualisés de rhizomes (Figure 25C);



Figure 21. Illustrations des trois modalités pour la transplantation expérimentale du Castellás.

Les trois lots expérimentaux ont été réimplantés en 3x3 linéaires dans le fond du bassin en tenant compte du gradient d'humidité Sud/Nord du terrain. La répartition des échantillons de canne a toutefois été limitée à la partie Nord du bassin afin de ne pas nuire à son fonctionnement hydraulique. Afin d'évaluer à court terme les capacités d'établissement, de croissance et de colonisation en fonction des différentes modalités, nous avons pris en compte les variables suivantes sur chaque individu transplanté : reprise/mortalité ; nombre de tiges par touffe ; nombre de tiges avec panicules par touffe ; circonférence des touffes ; hauteur de la plus grande tige par touffe. Le tableau ci-dessous présente les moyennes et les écart-types à partir des mesures de suivi réalisées sur le terrain, pour chaque modalité de transplantation et pour les différentes variables. Les résultats ont été obtenus par les mesures de 40 transplants par modalité, sélectionnés aléatoirement (Tableau 4).

Tableau 3. Résultats de reprise et de croissance d'*A. donaciformis* suite à la transplantation expérimentale au Castellas après deux ans (2010).

| Modalité | taux reprise | nb panicules | nb tige > 1m | Ø tache (m) | hauteur (m) |
|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Mottes | 0,98 | 11,6 ± 8,1 | 24,6 ± 18,4 | 2,2 ± 0,7 | 2,1 ± 0,2 |
| Amas | 0,60 | 1,2 ± 2,5 | 1,7 ± 2,9 | 0,7 ± 0,4 | 1,2 ± 0,5 |
| Nus | 0,17 | 0,1 ± 0,4 | 0,4 ± 0,8 | 0,7 ± 0,2 | 0,9 ± 0,3 |

Il ressort clairement que la transplantation en mottes s'avère de loin la plus efficace puisqu'on observe 98 % de reprise. Celle-ci chute à 60 % lorsqu'on implante des amas de rhizomes, pour tomber à seulement 17% avec des rhizomes nus. Cette différence dans la reprise se traduit également au niveau des divers paramètres mesurés au niveau de l'appareil végétatif. Le nombre de tiges avec panicule, le nombre de tiges supérieures à 1 mètre et la hauteur maximale des touffes constituent de bons estimateurs de la vigueur de la plante. A chaque fois la modalité en « mottes » présente le plus grand nombre de tiges supérieures à 1 mètre, de tiges avec panicules et la plus grande taille. Les différences entre les modalités et notamment entre la modalité en « mottes » et les deux autres s'avèrent également très significatives. Enfin, la circonférence de la tache reflète la rapidité d'installation et les capacités colonisatrices ; là encore la transplantation en « mottes » permet une expansion bien plus importante (trois fois plus) que les deux autres modalités (Figures 26 et 27).

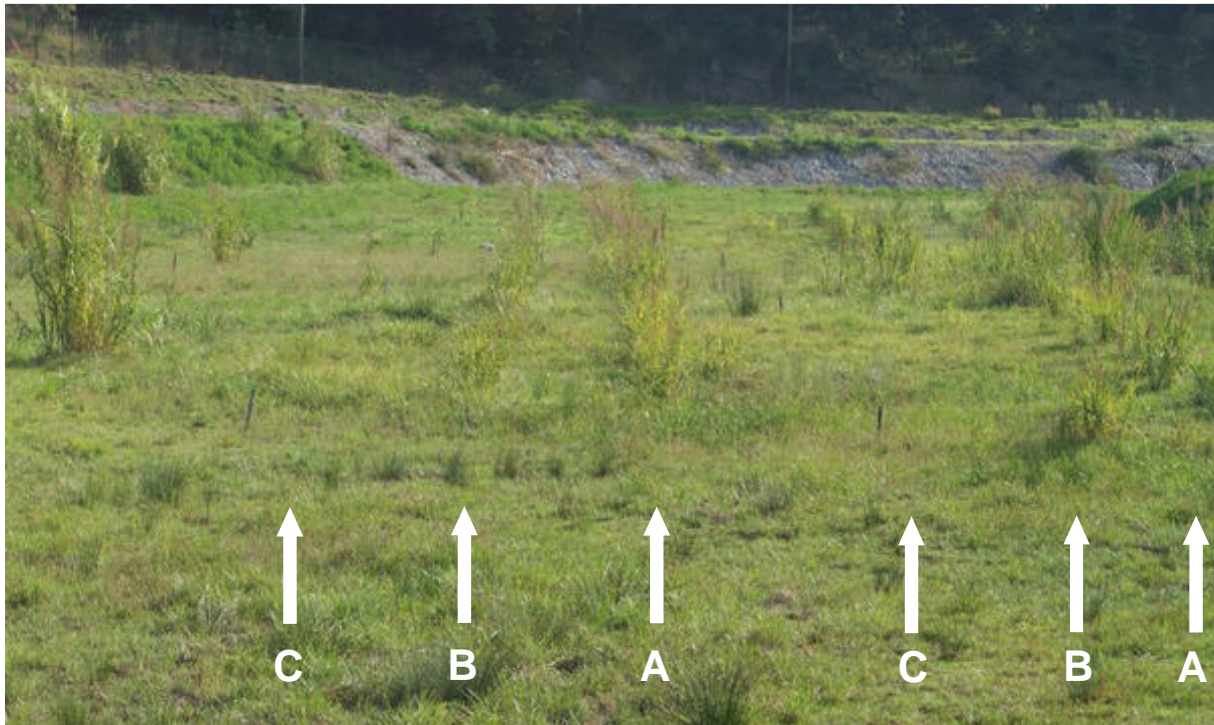


Figure 22. Aperçue de la transplantation en octobre 2010. Les flèches blanches indiquent des alignements de canne correspondant aux différentes modalités expérimentées (Cf. ci-dessus).

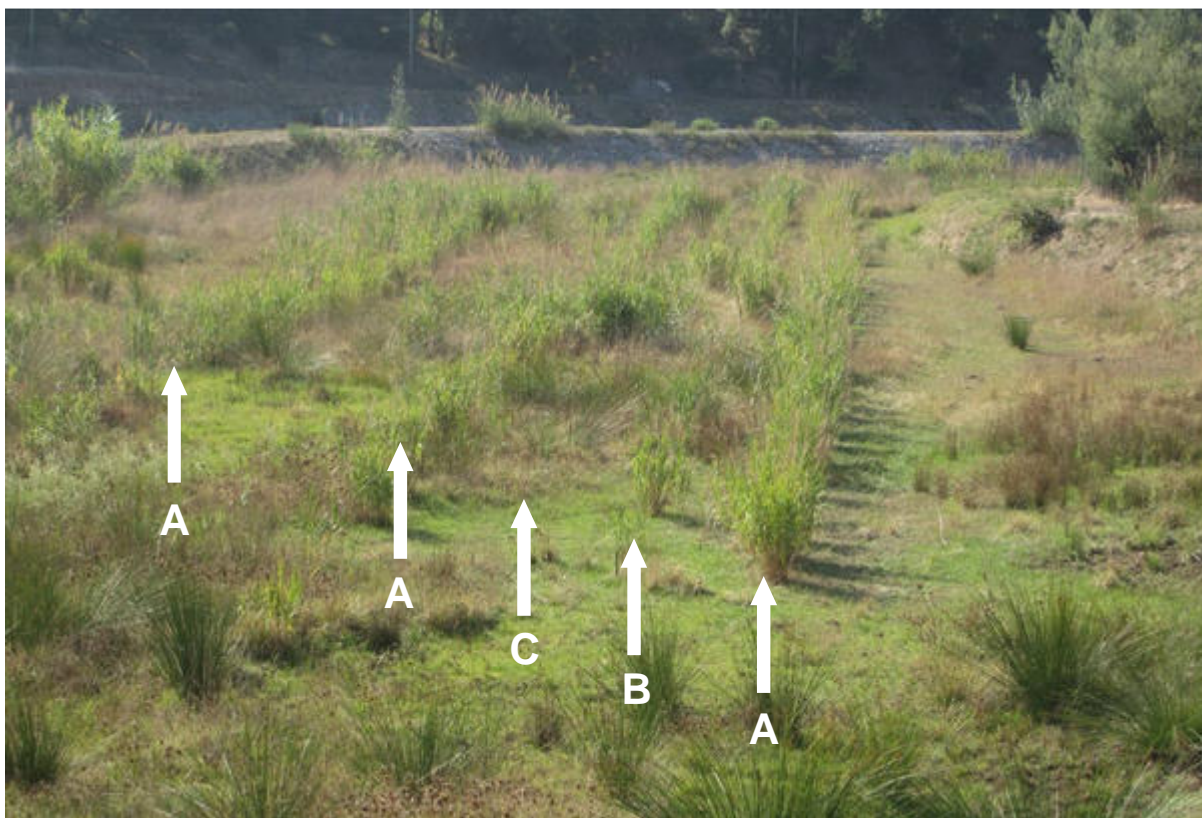


Figure 23. Aperçue de la transplantation en octobre 2011. Les flèches blanches indiquent des alignements de canne correspondant aux différentes modalités (Cf. ci-dessus).

Cette transplantation expérimentale montre clairement que les cannes doivent être déplacées en mottes, afin d'assurer, au moins à court terme, une reprise très importante. Cette modalité s'accompagne également de l'établissement de touffes ayant les meilleures vigueur végétatives. De plus, le suivi de la circonférence de ces taches indique que cette modalité permet un établissement nettement plus rapide auquel fait suite un processus de colonisation. Il est évident que les résultats de cette expérience ne peuvent encore refléter la « réussite » ou non de la transplantation, puisque le pas de temps écoulé s'avère bien trop court et qu'aucune étude de milieu n'a été réalisée. Cependant, d'après nos premières observations réalisées en 2011, le fond du bassin écrêteur du Castellans n'était pas en adéquation avec l'écologie de l'espèce. En effet, celle-ci se développe en milieu ouvert, sur les talus et les replats dépourvus d'eaux stagnantes. Or, le fond du bassin reste en partie immergé en hiver et au printemps. Cela s'est traduit par un aspect jaunâtre de tous les pieds transplantés, traduisant leur asphyxie, et par le développement d'espèces de milieux humides (*e.g. Juncus, Cyperus, Scirpus*) qui ne vivent jamais avec la canne dans les autres stations. Ces observations sont d'ailleurs confirmées par l'anatomie, puisque les rhizomes d'*Arundo* ne possèdent pas comme ceux des *Phragmites* une assise aérifère permettant les échanges gazeux dans l'eau. Cette inadéquation de site a aussi été confortée par l'étude floristique. En conséquence, les bassins ne peuvent en aucun cas servir de site récepteur. Eventuellement seuls les talus et les berges de ces bassins pourraient être utilisés, seulement si:

- les eaux n'y stagnent pas longtemps,
- les cannes ne constituent pas un obstacle à l'écoulement des eaux,
- les cannes n'endommagent pas l'ouvrage,
- les talus et digues ne sont pas soumis à un entretien intensif (fauchage, biocides...).

Une conservation *in situ* d'*A. donaciformis* avait aussi été envisagée afin d'éviter son élimination totale de la Gabelle, et pour stabiliser les berges au-dessus du chenal. Le maintien sur ce site d'une station d'environ 400m² était prévu en complément de la transplantation expérimentale de 2100m² au Castellans. Ainsi, les rhizomes de la station originale, n'ayant pas fait l'objet de transplantation, ont été mis en jauge pendant les travaux au sein de tas de terre (Figure 28). Malheureusement, ils ont disparu peu avant la fin des travaux. De fait, aucune remise en place n'a pu être réalisée sur la butte prévue. Il en résulte que la conservation *in situ* n'a pas été réalisée et les 400 m² prévus ont été perdus. Au final, les calculs permettent de

conclure que 53 m² de surface ont été conservés *ex situ* et 2747 m² détruits *in situ*, soit une perte sèche de 2,3% de la distribution totale de l'espèce à Fréjus.



Figure 24. Tas de rhizomes conservés *in situ* pendant les travaux dans le quartier de la Gabelle, avant leur disparition (Fréjus, juillet 2009).

Suivi de la restauration d'une station de Canne de Fréjus à la maison de retraite EHPAD et de la transplantation consécutive à l'aménagement d'un rond-point. Un emplacement a été réservé au Plan Local d'Urbanisme de la ville de Fréjus pour la création d'un giratoire d'envergure par le Conseil Général du Var (CG83) à l'intersection de l'Avenue André Léotard et du Chemin de Valescure (Figure 29). Il s'agit d'un aménagement porté par le CG83 dont l'emprise interfère avec une fraction de station de canne se développant en périphérie d'un terrain viticole. La plante se cantonne en limite séparative Nord-Ouest, Ouest et Sud du terrain sur un linéaire de plus de 250 m. La recherche de solutions alternatives et la mise en œuvre de mesures d'évitement ont permis au Maître d'Ouvrage de limiter l'impact de son giratoire à des effectifs de canne localisés en bordure de l'avenue André Léotard (Walicki 2013).

La Ville de Fréjus propose de procéder à la « sauvegarde » par transplantation de mottes de canne impactées par le projet. Le lieu d'accueil se situe dans le vallon de Valescure, un des sites les plus remarquables recensés sur le territoire communal. Il s'agit d'une surface de 1 880m² sur laquelle se trouvent à l'heure actuelle des remblais sauvages provenant des aménagements urbains survenus dans le secteur ces dernières années. La CAFSR propose la restauration du site par l'enlèvement et l'évacuation des remblais afin de retrouver la topographie originelle (Walicki, 2013).

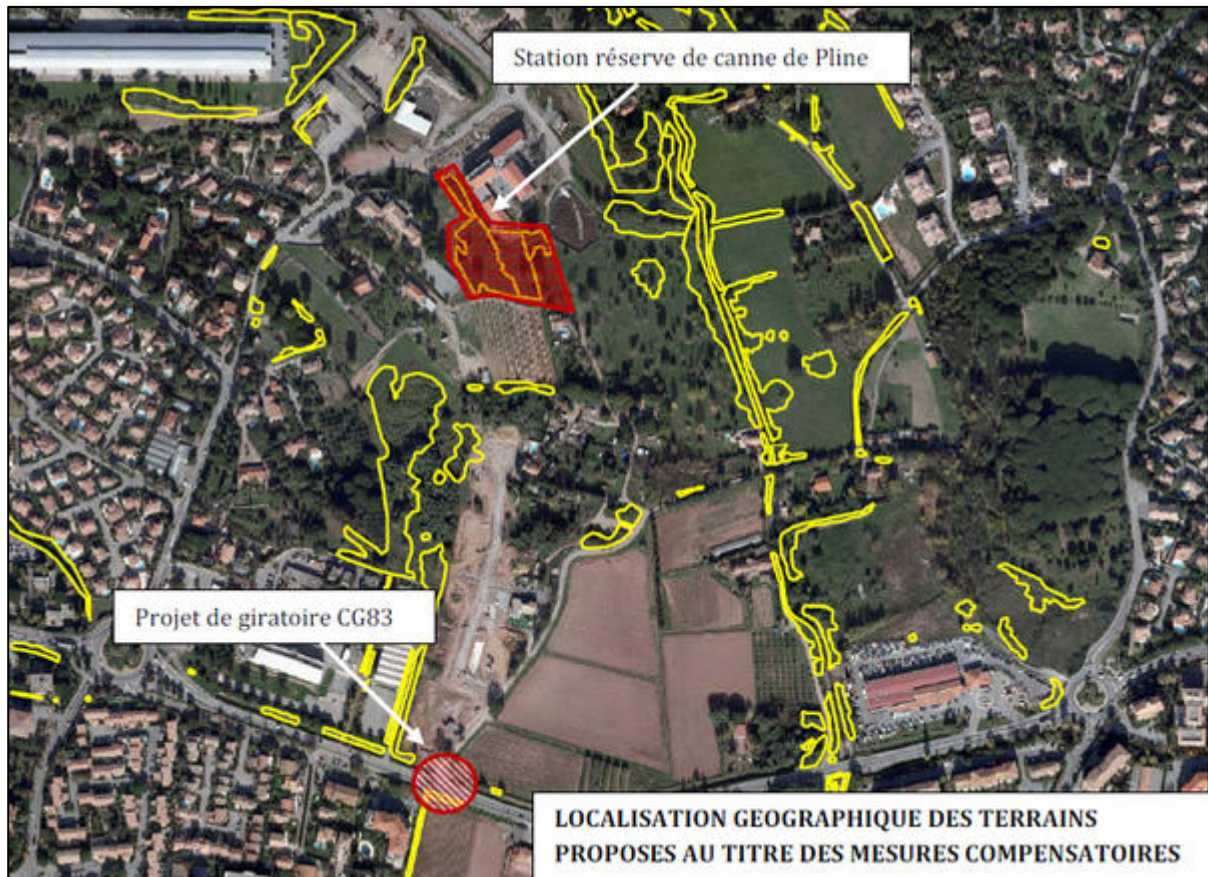


Figure 25. Zone de restauration proposée (station réserve de canne) pour recevoir les rhizomes du giratoire CG83. (D'après Walicki 2013).

Cette restauration a pris effet les 27, 28 et 29 août 2013. Plusieurs centaines de mètres cubes de gravats ont été retirés de la station Réserve. Les cannes présentes sur les monticules ont été prélevées, puis ont été réimplantées après déblaiements. Le 12 septembre, les travaux se sont poursuivis avec le transfert et la transplantation en mottes des cannes extraites au niveau du rond point (Planche 5). La station réserve de canne dite du "Centre Kerjean", proposée en mesure compensatoire, est localisée sur des terrains communaux. Les élus se sont engagés à ce que ce périmètre, actuellement inscrit en zone à urbaniser (Z AU1) au Plan Local d'Urbanisme (PLU), soit reclassé en zone naturelle définitivement soustraite aux pressions d'urbanisation à l'occasion d'une prochaine modification de ce PLU (Planche 6).



Planche 5. Récolte de rhizomes d'*A. donaciformis* consécutive à l'aménagement d'un rond-point en vue d'une transplantation à l'EHPAD (Fréjus).



Evacuation des remblais

Second tri à la recherche de rhizomes dans les remblais évacués

Réimplantations de la canne (rhizomes et touffes) après évacuation des remblais

Ouverture de tranchées peu profondes, mis en place de la canne et recouvrement faible.

Planche 6. Transplantation de rhizomes à l'EHPAD consécutive à l'aménagement d'un rond-point impactant une station d'*A. donaciformis* (Fréjus).

Expertise écologique du bassin écrêteur du Peyron à la réception de transplantation d'*Arundo donaciformis* du petit défend (EPSILON II, St-Raphaël).

Selon le « Dossier de demande de dérogation pour l'enlèvement de spécimens d'espèces végétales protégées sur le territoire de la commune de Saint-Raphaël » réalisé par le Service Environnement de la Communauté d'Agglomération de Fréjus-St Raphaël au printemps 2013, le vallon situé à l'Est du Technoparc Epsilon II sur la commune de St-Raphaël, a fait l'objet d'importants remblaiements non autorisés et constitués de quelques dizaines de milliers de mètres cubes de matériaux hétéroclites devenant aujourd'hui instables et dangereux. En effet, un bureau d'étude mandaté par la CAFSR a révélé un risque sérieux de glissement de terrain. Face à l'urgence d'une remise en sécurité de ce vallon, la CAFSR a décidé d'engager des travaux de réhabilitation du site dans les plus brefs délais. Toutefois, l'étude d'impact réalisée a mis en évidence la présence d'*A. donaciformis*. L'espèce s'est installée sur les remblais à la faveur de transport de terre contenant des rhizomes illégalement arrachés sur d'autres sites de la commune. Sur ces remblais, la canne se présente sous forme de plusieurs petites taches de quelques dizaines de mètres carrés. La sécurisation du site, qui impose à la collectivité de réaliser des travaux de stabilisation, nécessite qu'*A. donaciformis* soit retiré. En l'absence de solution alternative, la CAFSR préconise la sauvegarde des pieds de canne par leur transplantation sur un autre site. Dans leur demande de dérogation de déplacement d'espèce auprès du Conseil National de la Protection de la Nature (CNPN), la CAFSR propose comme site d'accueil, le site du « barrage écrêteur » du Peyron, situé à proximité. Il s'agit d'un ouvrage hydraulique classé en zone naturelle au Plan Local d'Urbanisme et en zone inondable au niveau du PPRI. Ce terrain public préalablement identifié par les agents du Service Environnement de la CAFSR fait l'objet de la présente étude. Afin de déterminer les potentialités d'accueil d'*A. donaciformis* sur ce site, nous avons successivement exploré la flore qui s'y développe et analysé le sol en différents points.

Le site d'accueil potentiel a fait l'objet d'inventaires floristiques réalisés par un bureau d'étude. Afin de les resituer dans les conditions phytoécologiques naturelles de la canne, ils ont été comparés à nos 30 relevés effectués sur la CAFSR (Chap. IV). Ainsi, sur le site du bassin écrêteur du Peyron, nous avons réalisé trois relevés le 10 avril 2012 et le 28 mai 2013 (de A à C ; figure 30), ainsi que quatre prélèvements de sol (de 1 à 4 ; figure 30). Afin de situer la place de ces relevés dans les conditions pédologiques de la canne, ils ont été comparés aux 40 déjà effectués en présence de l'espèce sur la CAFSR.



Figure 26. A gauche, localisation des échantillons pour l'expertise du site de transplantation du bassin écrêteur du Peyron (St-Raphaël) et zone proposée par la mairie pour la transplantation (périmètre rouge) ; à droite, ajustement de la zone de transplantation selon l'expertise écologique (périmètre rouge).

Les trois relevés effectués sur le site de transplantation proposé se répartissent dans deux ensembles (Figure 31). Le relevé A se place dans le groupe de la flore mésophile rudérale, tandis que les relevés B et C se situent dans le groupe de la végétation des milieux très humides. Pour avoir un référentiel, le relevé B a été effectué dans une Phragmitaie, sa place est donc tout à fait logique. Le relevé C, réalisé dans le tiers Sud-Ouest de la parcelle de transplantation, reflète une végétation très hygrophile, dans lequel il n'y a pas d'*Arundo* mais seulement des *Phragmites* sur un sol gorgé d'eau plusieurs mois de l'année. Les conditions qui prévalent dans ce site sont très proches de celles trouvées lors de la première transplantation dans le bassin écrêteur du bassin du Castellas. Par contre, le relevé A correspond à la flore observée dans la majorité des relevés où figure *A. donaciformis*.

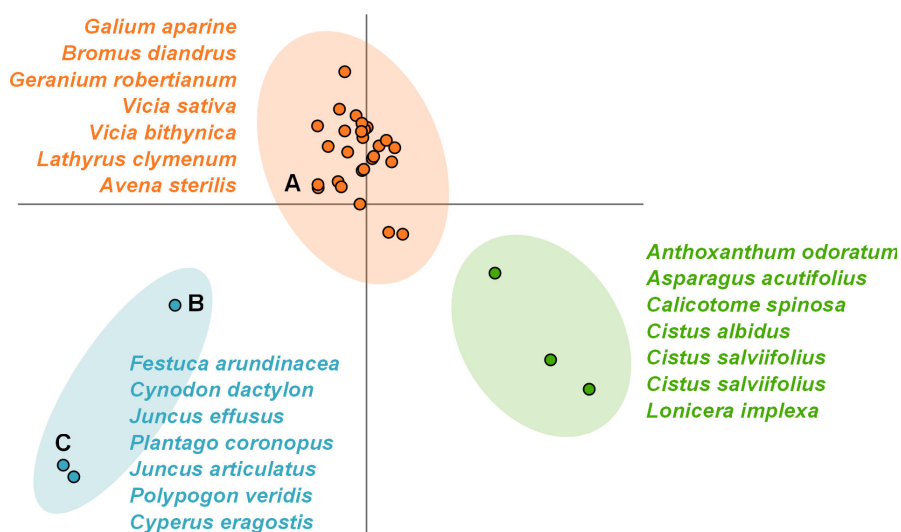


Figure 27. Positions des échantillons du site receveur dans l'analyse factorielle des correspondances des relevés floristiques (A, B, C, cf. figure 30).

D'un point de vue phyto-écologique, tous les emplacements ne se valent pas dans la parcelle potentielle de transplantation. Le quart Sud-Ouest (relevé C) ne convient pas, tandis que le reste de la parcelle (relevé A) présente les conditions similaires à la majorité des stations de canne de Fréjus dans la CAFSR. Les quatre échantillons de sol prélevés dans le bassin écreteur du Peyron figurent en vert et rouge dans les boxplots (Figure 32). On constate que sur les 14 variables analysées, le relevé 3 (= C, en rouge dans les boxplots) déjà singularisé par sa flore apparaît presque toujours parmi les valeurs extrêmes, alors que les relevés 1-2 et 4 (en vert), s'avèrent très majoritairement au sein des boxplots (50% des valeurs), *i.e.* dans les conditions physico-chimiques moyennes prévalant pour l'ensemble des échantillons analysés dans la CAFSR. Il ressort donc clairement de cette étude que le relevé 3 possède des valeurs physico-chimiques s'écartant des valeurs observées dans les sols où pousse *A. donaciformis*.

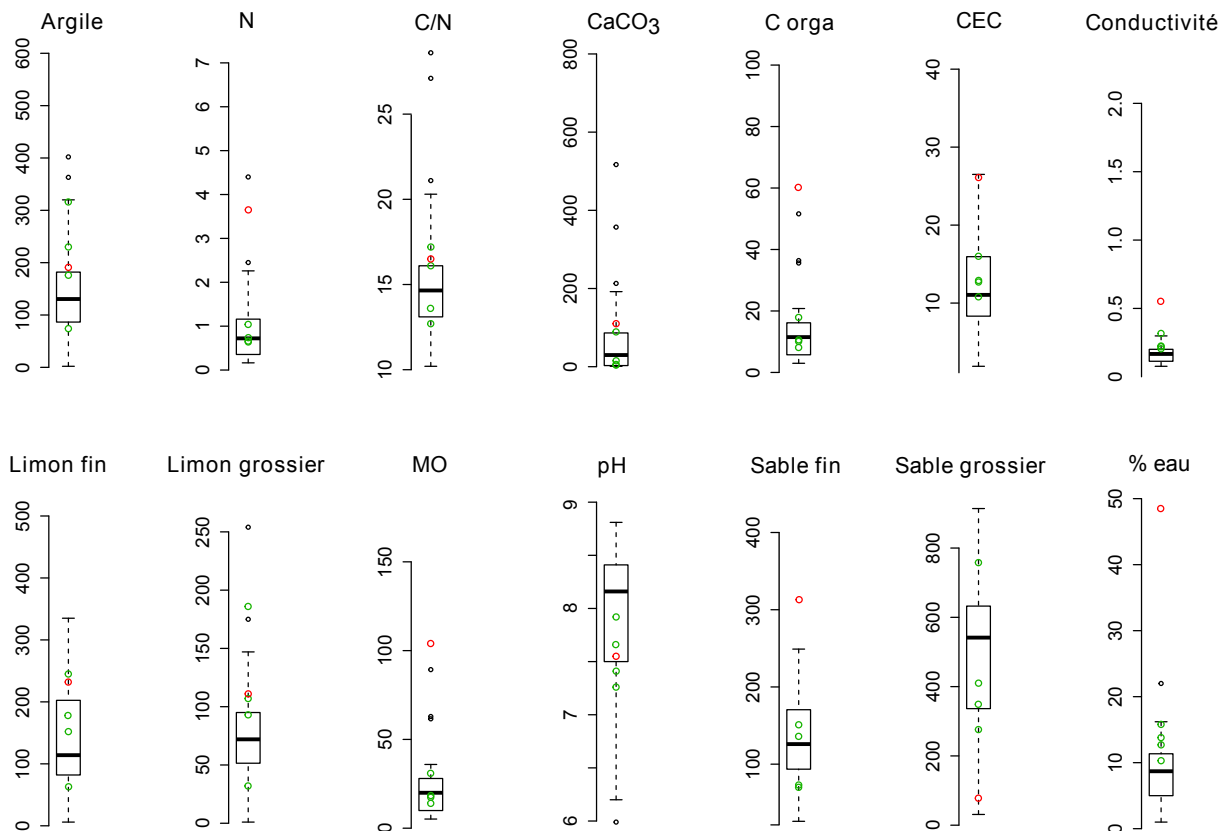


Figure 28. Position des quatre prélèvements de sol dans l'enveloppe physico-chimique des sols occupés *Arundo donaciformis*. En rouge, le site 3, défavorable à l'espèce.

VII.2. Recherches appliquées : élaboration d'un plan de conservation pour *Arundo donaciformis* à Fréjus

Il s'agit de la transposition de nos résultats de recherche pour l'élaboration du plan de conservation concerté. Les lignes ci-dessous visent seulement à dégager quelques objectifs indispensables pour sa réalisation, afin d'assurer la conservation de la canne de Fréjus dans la CAFSR sans compromettre le développement économique. Pour ce faire, il faut :

1/ Acquérir des connaissances scientifiques sur l'espèce :

- En systématique : limite du taxon
- En écologie : préférendum de l'espèce
- En génétique et en biologie de la reproduction
- En sciences sociales : Enquêtes sociologiques sur la perception de l'espèce
- Etude ethnobotanique : subsistance des savoirs et pratiques liés à la canne de Fréjus
- Approche archéologie : lien historique avec les nombreux vestiges archéologiques.

2/ Acquérir des connaissances applicables à sa conservation :

- Transplantation expérimentale du Castellans : modalités de transplantations
- Choix des sites de transplantation
- Modalités de restauration de sites
- « Entretien » des stations.

3/ Constituer un réseau dynamique de stations refuges à l'échelle de la CAFSR :

- A partir des connaissances acquises en génétique (stations à conserver en priorité)
- A partir des connaissances relatives à l'écologie de l'espèce
- En lien avec la perception de l'espèce par les divers acteurs.

4/ Définir et mettre en œuvre les pratiques de gestion de la canne :

- Stations « réserves » qualité habitat et préférendum écologique
- Diversité des habitats (espèce clonale)
- Pratiques de gestion des stations
- Actions de sensibilisation des différents acteurs locaux.

5/ Valoriser la canne de Fréjus comme un élément de l'identité de Fréjus :

- Actions de sensibilisation du grand public
- Sensibilisation des acteurs de l'urbain (*e.g.* techniciens des espaces verts ; encadré 3).

6/ Suivis et évaluations des actions liées à la mise en place du plan d'actions :

- Suivi complet de la distribution de l'espèce
- Suivis des transplantations et restaurations
- Suivis de la perception.

Le tableau 5 résume des principaux résultats déjà obtenus (en vert), les actions prochainement mises en œuvre (en jaune) et celles inscrites sur le plus long terme (en orange).

Tableau 4. Intégrations de nos résultats au plan de conservation d'*A. donaciformis* à Fréjus.

| Objectifs | Disciplines | Outils | Résultats |
|---|--|---|---|
| 1/ Acquérir des connaissances scientifiques sur l'espèce : | Systématique : limite de l'espèce | Morphologie Cytogénétique Génétique | Description de 3 espèces dont une endémique de Fréjus |
| | Ecologie : préférendum de l'espèce | Flore Edaphique | Inclus dans une végétation mésophile rudérale. Large amplitude édaphique, mais toujours sur sols drainants |
| | Distribution | Cartographie SIG | Réseau hydrique, linéaires... Lien étroit avec l'agricole. Régression de 22 à 12ha en 20 ans due à l'urbanisation |
| | Génétique et biologie | AFLP | Clone |
| | Sciences sociales : Enquêtes sociologiques, perception de l'espèce | | deux visions opposées : vulnérable vs. résistante, voire envahissante... |
| | Ethnobotanique : subsistance des savoirs anciens sur la canne | | Traces presque disparues |
| | Archéologie : lien historique, vestiges archéologiques | | Distribution limitée à l'ancien rivage, importance à l'époque romaine |
| 2/ Acquérir des | Transplantation du | Suivis et mesures | Réussite des transplantations |

| | | | |
|--|--|--|--|
| connaissances applicables à sa conservation | Castellas : modalités de transplantations | | « en mottes » Choix de sols drainants |
| | Choix des sites de transplantation | Transplantation Analyses édaphiques et floristiques | Milieus ouverts, sur talus, sol drainant... Jamais lieux inondés |
| | Modalités de restauration de sites | Transplantation expérimentale | En cours |
| | « Entretien » des stations | | Se limiter à contenir les envahissements d'autres espèces (sans fauchage, ni biocides) |
| 3/ Constituer un réseau dynamique de stations refuges dans la CAFSR | A partir des connaissances acquises en génétique (stations à conserver en priorité) | AFLP | Pas de station prioritaire sur ce critère |
| | A partir des connaissances relatives à l'écologie de l'espèce | | Préférendum écologique : talus de bord de cours d'eau Trame verte et bleue |
| | En lien avec la perception de l'espèce | | Réhabiliter l'image de l'espèce par son caractère patrimonial |
| 4/ Définir et mettre en œuvre les pratiques de gestion de l'espèce | Stations « réserves » qualité habitat et préférendum écologique - Diversité des habitats | | Maîtrise du foncier |
| | Pratiques de gestion des stations | | Impact du fauchage à établir Recommandations |
| | Actions de sensibilisation des différents acteurs | | Programme à mettre en place |
| 5/ Valoriser la canne : emblème de Fréjus en lien avec son passé | Actions de sensibilisation du grand public | Scientifiques, DREAL, CAFSR | Journée des plantes Fiche de sensibilisation... |
| | Actions de sensibilisation des acteurs de l'urbain (techniciens, cadres, | Scientifiques, DREAL, CAFSR..... | Formations des personnels : Reconnaissance de l'espèce Notions de biodiversité, |

| | | | |
|--|---|--|--|
| | décisionnaires de la ville de la CAFSR, du CG...) | | d'endémisme, de conservation, des enjeux nationaux |
| 6/ Evaluations liées à la mise en place du plan d'actions | Suivis des transplantations | | Evaluation à moyen terme |
| | Suivis de la restauration | | Evaluation réussite |
| | Suivis des autres stations | | Evolution, dynamique... |
| | Suivis de la perception | | Pour un plan de gestion réussi |

Encadré 3. Sensibilisation scientifique des acteurs locaux

L'objectif de ces actions est d'aller vers un engagement des acteurs locaux pour une meilleure gestion concertée de la canne de Fréjus en tenant compte de leurs contraintes. Pour ce faire, nous proposons de développer « des mini-stages ou mini-formations » qui pourront être développés en deux temps. Dans un premier temps, nous proposons de sensibiliser l'ensemble des acteurs sur les thèmes de la biodiversité, de l'endémisme et des espèces protégées. Dans un second temps, nous proposons une action ciblée en fonction du public. L'action au niveau des acteurs des services techniques et aux chefs de chantier pourrait être complétée par une formation à la reconnaissance de l'espèce et à son écologie. Ceci est d'autant plus important que lors des entretiens il est apparu très clairement que les techniciens en contact avec l'espèce étaient mal ou pas informés et surtout trop peu impliqués sur ces sujets (Barthelemy *et al.* 2012). Lors de ces informations, les animateurs des sessions pourront recueillir les points de vue des acteurs conviés pour articuler au mieux leurs contraintes professionnelles et les exigences de la canne de Pline. Il s'agira de chercher un *modus operandi* favorable aux deux « mondes », celui des techniciens et celui de la canne.

La sensibilisation vers le grand public pourrait se faire *via* l'aménagement de petits espaces « Canne de Pline » avec des panneaux d'information. Les lieux le plus emblématiques semblent être les sites de la Gabelle et de la première transplantation au Castellans. Cela pourrait être étendu dans plusieurs espaces verts de la ville en complément de l'aménagement de ronds points... La communication au grand public devrait aussi se réaliser sous forme d'article dans le journal de la ville, dans la presse....

Ces actions nous permettraient de valoriser l'espèce si possible *via* une appellation "Canne de Fréjus". En améliorant sa visibilité, elle pourrait ainsi devenir l'emblème du Patrimoine botanique/naturel de la ville. Outre l'espèce, la gestion mise en place à l'échelle de la ville devrait aussi être montrée comme un cas d'école de prise en compte de la complexité de la protection d'une espèce végétale rare et menacée en milieu urbain.

VII.3. Recherches fondamentales : systématique et phylogéographie à Taïwan

Les milieux insulaires constituent des laboratoires privilégiés pour les études en biogéographie et en évolution de par leur isolement du continent qui permet de limiter les phénomènes de migrations et d'exacerber les processus de différenciation. Ce principe fondateur en biogéographie insulaire prévaut aussi dans le genre *Arundo*, avec une importante diversité taxonomique propre à Taïwan. L'île de Formose représente le challenge taxonomique le plus complexe du genre, puisque la présence des deux morphotypes d'« *A. donax* » (Manuscrit J) et de l'endémique très polymorphe *A. formosana* a donné lieu à la description sur l'île de plusieurs taxons dont le rang reste à préciser. Basée sur 75 échantillons d'herbier (TAIF) récents (Figure 33), la révision des *Arundo* à Taïwan constitue le préalable indispensable à celle du genre en Asie. Ce travail comprendra les marqueurs déjà utilisés, *i.e.* morphologiques (quantitatifs et qualitatifs), et moléculaires avec les séquences d'ADNcp, mais aussi de nouveaux comme des microsatellites nucléaires, reflet de la différenciation du génome nucléaire.

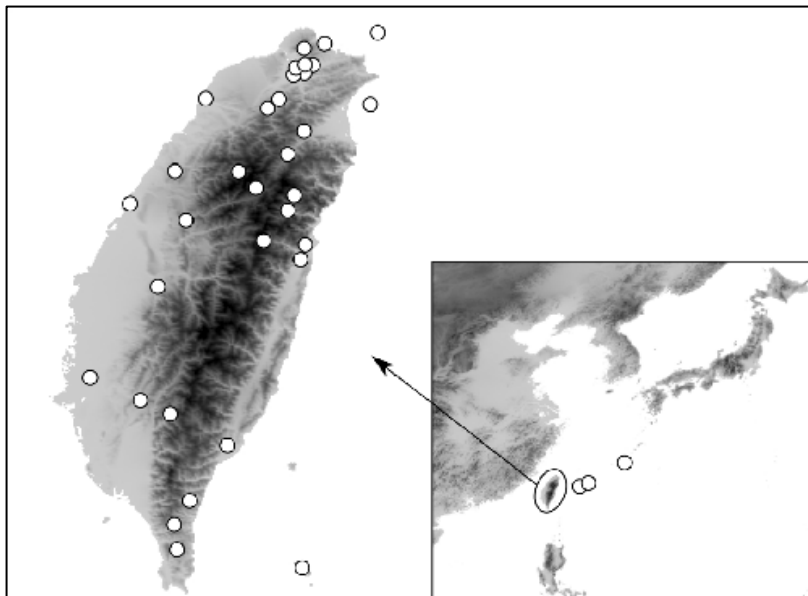


Figure 29. Distribution des spécimens d'herbier d'*A. formosana* et d'*A. donax* en prêt (TAIF) pour la révision taxonomique à Taïwan.

VII.4. Recherches fondamentales : phylogénie des Arundinoideae Burmeist., et origine du genre *Arundo*

« In my opinion, the climax of flowering-plant evolution is represented by the grasses, which, in addition, are the most useful to man of all families », G.L. Stebbins 1974. In Anorld. *Flowering Plants : evolution above the species level*.

Bien que plusieurs familles d'Angiospermes dépassent par leur richesse spécifique celle des Poaceae, cette dernière affiche une diversification écologique sans équivalent. Grâce à de nombreuses adaptations (*e.g.* métabolisme en C4; GPWG II 2012), ces herbacées ont conquis tous les écosystèmes terrestres, et sont même devenues des espèces-clés structurant les pelouses et prairies naturelles qui couvrent 24% des terres émergées (Shantz 1954), sans tenir compte des cultures. Parmi les 10.000 espèces de graminées (Clayton & Renvoize 1986), la domestication des quatre céréales les plus importantes génère la moitié de la production agricole mondiale (FAOSTAT 2010). Par leur domestication, sélection, hybridation et polyploïdisation, puis par leurs modifications génétiques, les graminées comme le maïs, le riz, le blé, demeurent historiquement liées aux progrès scientifiques et au développement des sciences du vivant, faisant des Poaceae un modèle biologique de premier ordre (Prat 1960).

Systematique des Poaceae. Les connaissances sur les Poaceae s'accumulèrent exponentiellement sur deux siècles grâce à des études fondamentales et appliquées. La systématique des graminées a donné lieu dès le XVII^{ème} siècle à une première classification proposée par Robert Brown (1810). Ce travail précurseur sépare judicieusement les Poaceae en deux principaux groupes ('tribus'), les Pooideae et les Panicoideae, une dichotomie encore utilisée aujourd'hui malgré certains changements nomenclaturaux (GPWG 2001). Maints travaux systématiques vinrent ensuite étayer cette classification, portant sur l'anatomie des feuilles (Duval-Jouve 1875), l'embryologie (Van Tieghem 1897), la caryologie (Avdulov 1931) et les structures épidermiques (Prat 1960). Jusqu'à la fin du XX^{ème} siècle, les agrostologistes reconnaissaient environ 14 tribus réunies dans deux à trois sous-familles: les Pooideae, les Panicoideae et les Phragmitiformes-Bambusoideae (Auquier 1963). Après diverses propositions, la collaboration des chercheurs du Grass Phylogeny Working Group a permis l'élaboration d'une classification raisonnée basée sur des données moléculaires et morphologiques, les 13 sous-familles délimitées forment deux groupes principaux, le BEP (Bambusoideae, Ehrhartoideae, Pooideae) et le PACMAD (GPWG 2001, 2012).

Systématique des Arundinoideae. Décrit par Burmeister (1837) puis amendé par Dumortier (1923), la sous-famille des Arundinoideae fut longtemps considérée comme le groupe poubelle des graminées (Auquier 1963), réunissant jusqu'à 72 genres (Renvoize 1981). Les premières approches évolutionnistes de la systématique des Poaceae ont d'abord jugé cette sous-famille comme un ensemble archaïque, en raison de l'association de caractères morphologiques partagés avec d'autres grandes sous-familles, *i.e.* une distribution tropicale et des épidermes semblables aux Panicoideae, des épillets comprimés latéralement et à fleur apicale stérile de type Poideae (Prat 1960), et enfin un port et des chromosomes (nombres et tailles) de type Bambusoideae. Si les Arundinoideae se caractérisaient par leurs generitypes, les 'roseaux' *Arundo* et *Phragmites* (d'où le nom Phragmitiformes), ils contenaient aussi des genres très diversifiés dans l'hémisphère Sud comme *Cortaderia*, *Merxmuellera* et *Danthonia* (Renvoize 1986). Puis, plusieurs études phylogénétiques ont montré (i) la polyphylie des Arundinoideae à partir des séquences ITS (ADNr, Hsiao *et al.* 1998) et chloroplastiques (*rbcL* et *rpoC2* ; Barker *et al.* 1995, 1999), et (ii) la monophylie d'une nouvelle sous-famille, les Danthonioideae Barker & Linder (GPWG 2001). Ceci a drastiquement réduit les Arundinoideae *s.str.* à 15 genres et environ 41 espèces (Tableau 6). Devenant ainsi une des plus petites sous-familles des Poaceae, les Arundinoideae restent aussi la moins bien résolue. A titre d'exemple, seuls 5 genres sur 15 ont déjà été séquencés.

| Genre | Espèces | Distribution |
|----------------------|-----------|----------------------|
| <i>Phragmites</i> | 5 | Cosmopolite |
| <i>Arundo</i> | 5 | Eurasie subtropicale |
| <i>Molinia</i> | 2 | Eurasie |
| <i>Dichaetaria*</i> | 1 | Inde |
| <i>Zenkeria</i> | 5 | Inde |
| <i>Hakonechloa</i> | 1 | Japon |
| <i>Leptagrostis*</i> | 1 | Est Afrique |
| <i>Crinipes</i> | 2 | Est Afrique |
| <i>Nematopoa*</i> | 1 | Sud Afrique |
| <i>Dregeochloa</i> | 2 | Sud Afrique |
| <i>Piptophyllum*</i> | 1 | Sud Afrique |
| <i>Styppeiochloa</i> | 3 | Sud Afrique |
| <i>Elytrophorus</i> | 2 | Afrique |
| <i>Amphipogon</i> | 9 | Australie |
| <i>Monachather</i> | 1 | Australie |
| Total | 41 | |

Tableau 5. Richesse spécifique et distribution géographique des genres d'Arundinoideae (Poaceae). *, genres monospécifiques très rares manquants dans nos données moléculaires (Figure 33).

Résultats préliminaires pour la phylogénie des Arundinoideae. En parallèle à nos travaux sur le genre *Arundo*, plusieurs extractions et séquençages d'ADN ont été réalisés sur d'autres d'Arundinoideae. Ce matériel a été récolté par nous-mêmes ou donné par les herbiers consultés dans le cadre des travaux précédents. Au total, les séquences du rbcL et du rbcL-psaI de 25 espèces ont été alignées et analysées (en collaboration avec Dr. P.A. Christin, Sheffield University, UK ; méthode similaire à Christin *et al.* 2008). Les divergences du chronogramme obtenu ont été datées par calibration secondaire, à partir de la date de divergence Arundinoideae/Micrarioideae fournie dans des phylogénies de Poaceae plus larges, elles-mêmes calibrées à l'aide de fossiles (Christin *et al.* 2008).

Bien que ces travaux soient encore en cours, quelques résultats préliminaires se dégagent du chronogramme généré (Figure 34) :

(i) Tout d'abord, on constate la séparation très nette des genres *Arundo* et *Phragmites*, longtemps réunis dans le même genre ou considérés comme des genres voisins. Ainsi, ces données confirment la paraphylie de ces « roseaux » (au sens large) et leur convergence évolutive conduisant à de grandes tailles, des tiges robustes, et une affinité marquée pour les milieux humides.

(ii) Le genre eurasiatique *Arundo* est regroupé dans un clade hautement soutenu avec de petites graminées herbacées des savanes australiennes très dissemblables morphologiquement. Ce rapprochement phylogénétique des plus surprenants (*i.e.* cannes pérennes *vs.* annuelles de zones arides) illustre la forte diversité adaptative des Arundinoideae, malgré un très faible nombre de genres.

(iii) Le genre *Zenkeria* serait à intégrer dans la sous-famille voisine des Micrarioideae, décrite récemment (GPWG 2012) et incluant 3 petites tribus longtemps jugées inclassables. De plus, la prise en compte '*Eragrostis walterii*' et son inclusion dans les Arundinoideae devrait conduire à la publication d'une nouvelle combinaison (Ingram *et al.* 2011).

(iv) Le fait le plus surprenant de ce travail est que les sous-groupes formés dans le cladogramme (Figure 33) se différencient par certaines caractéristiques des épidermes (étude en cours), confortant ainsi la forte valeur de ces critères (Prat 1961). Cette étude devrait permettre une meilleure compréhension de la systématique et de l'évolution de ces petites graminées des régions chaudes longtemps déconsidérées de par leur haute divergence.

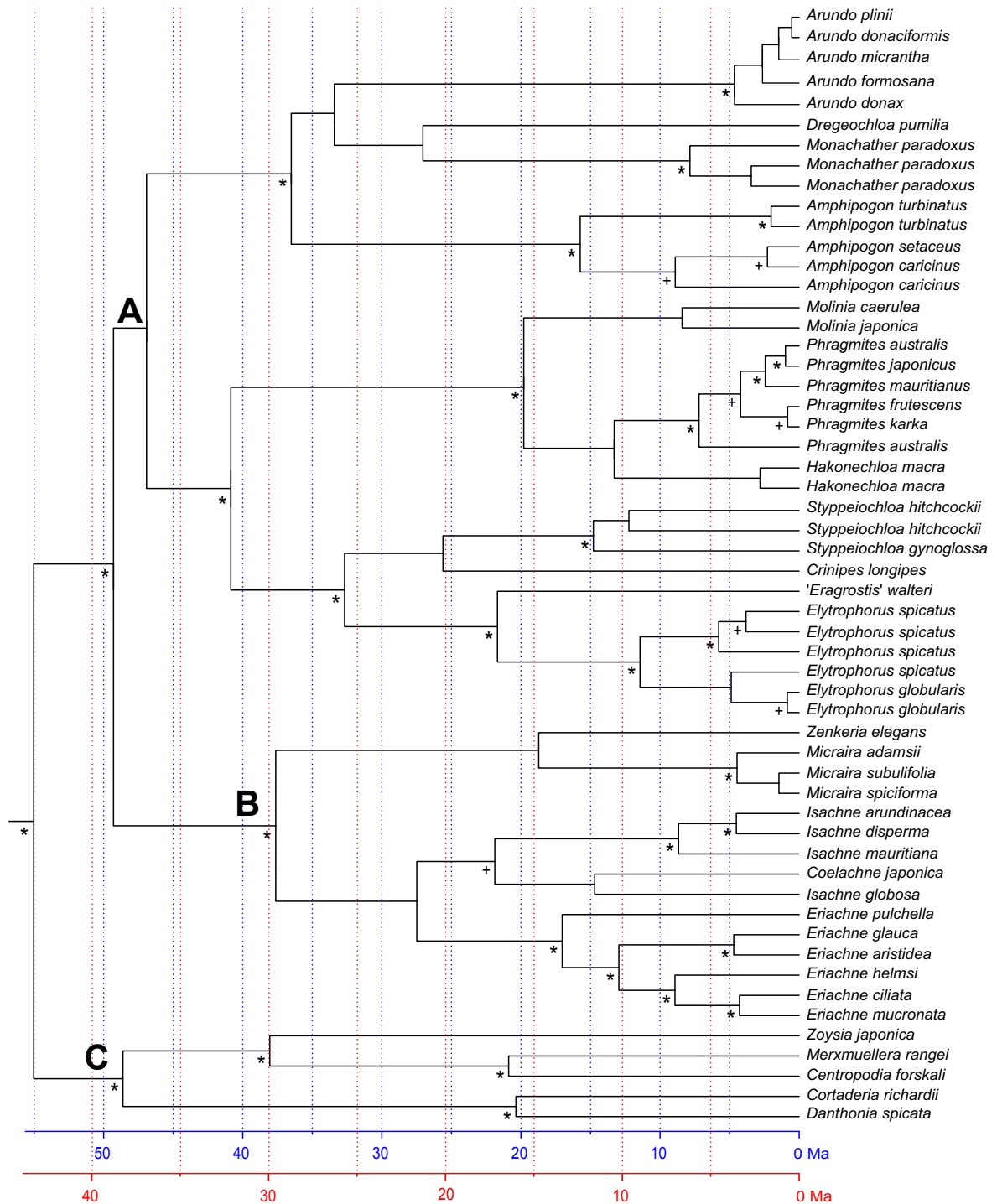


Figure 30. Chronogramme des Arundinoideae (A) et Micrairoideae (B), enraciné avec quelques Danthoideae (C). +, $pp > 0.75$, *, $pp > 0.95$. Echelle bleue, calibration prenant en compte les fossiles d'Ehrhartoideae (= Oryzoideae ; Prasad *et al.* 2011) ; échelle rouge, calibration ne prenant pas en compte les fossiles d'Ehrhartoideae. Analyse effectuée en collaboration avec P.A. Christin (University of Sheffield, UK).

Références

- Adams, K.L., Wendel, J.F., 2005. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends in Genetics* 21, 539–543.
- Agapow, P., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C., Purvis, A., 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *The Quarterly Review of Biology* 79, 161–179.
- Ahmad, R., Liow, P.-S., Spencer, D.F., Jasieniuk, M., 2008. Molecular evidence for a single genetic clone of invasive *Arundo donax* in the United States. *Aquatic Botany* 88, 113–120.
- Ainouche, M.L., Baumel, A., Salmon, A., Yannic, G., 2004. Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New Phytologist* 161, 165–172.
- Archetti, M., 2004. Recombination and loss of complementation: a more than two-fold cost for parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology* 17, 1084–1097.
- Auquier, P., 1963. Critères anciens et modernes dans la systématique des Graminées. *Natura Mosana* 16, 1–63.
- Bacchetta, G., Brullo, S., 2006. Taxonomic revision of the *Astragalus genargenteus* complex (Fabaceae). *Willdenowia* 36, 157–167.
- Bacchetta, G., Brullo, S., 2010. *Astragalus tegulensis* Bacch. & Brullo (Fabaceae), a new species from Sardinia. *Candollea* 65, 5–14.
- Baize, D., 2004. Petit lexique de pédologie. Editions Quae, Paris.
- Baize, D., Jabiol, B., 1995. Guide pour la description des sols. Editions Quae, Paris.
- Barker, N.P., Linder, H.P., Harley, E.H., 1995. Polyphyly of Arundinoideae (Poaceae): Evidence from rbcL Sequence Data. *Systematic Botany* 20, 423–435.
- Barker, N.P., Linder, H.P., Harley, E.H., 1998. Sequences of the grass-specific insert in the chloroplast rpoC2 gene elucidate generic relationships of the Arundinoideae (Poaceae). *Systematic Botany* 23, 327–350.
- Baumel, A., Ainouche, M.L., Levasseur, J.E., 2001. Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). *Molecular Ecology* 10, 1689–1701.
- Besnard, G., Baradat, P., Bervillé, A., 2001. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor Appl Genet* 102, 251–258.
- Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P., Bervillé, A., 2002. *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theor Appl Genet* 104, 1353–1361.
- Bonin, A., Bellemain, E., Bronken Eidesen, P., Pompanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13, 3261–3273.
- Bonnet, X., Shine, R., Lourdais, O., 2002. Taxonomic chauvinism. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 1–3.
- Bonnier, G., Douin, R., 1911-1935. Flore complète illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique. Tome 11. E. Orlhac éditions, Paris.
- Boose, Holt, 1999. Environmental effects on asexual reproduction in *Arundo donax*. *Weed Research* 39, 117–127.

- Bretagnolle, F., Thompson, J.D., 1995. Tansley Review No. 78. Gametes with the stomatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* 129, 1–22.
- Callmender, M.W., Schatz, G.E., Lowry, P.P., 2005. IUCN Red List assessment and the global strategy for plant conservation: taxonomists must act now. *Taxon* 54, 1047–1050.
- Campbell, L.M., 2005. Overcoming obstacles to interdisciplinary research. *Conservation Biology* 19, 574–577.
- Carvalho, M.R. de, Bockmann, F.A., Amorim, D.S., Brandão, C.R.F., 2008. Systematics must embrace comparative biology and evolution, not speed and automation. *Evolutionary Biology* 35, 150–157.
- Christin, P.-A., Besnard, G., Samaritani, E., Duvall, M.R., Hodkinson, T.R., Savolainen, V., Salamin, N., 2008. Oligocene CO₂ decline promoted C₄ photosynthesis in grasses. *Current Biology* 18, 37–43.
- Clayton, W.D., Renvoize, S.A., 1986. *Genera graminum. Grasses of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Comes, H.P., Kadereit, J.W., 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* 3, 432–438.
- Constance, L., 1964. Systematic Botany. An unending Synthesis. *Taxon* 13, 257–273.
- Cornille A, Gladieux P, Smulders MJ, et al. 2012. New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS genetics* 8, e1002703.
- Coste, H., 1906. *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes*. Librairie des Sciences et des Arts, Paris.
- Cozzolino, S., Cafasso, D., Pellegrino, G., Musacchio, A., Widmer, A., 2003. Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Molecular Ecology* 12, 2783–2792.
- Czech, B., Krausman, P.R., Borkhataria, R., 1998. Social construction, political power, and the allocation of benefits to endangered species. *Conservation Biology* 12, 1103–1112.
- Danin, A., 2004. *Arundo* (Gramineae) in the Mediterranean reconsidered. *Willdenowia* 34, 361–369.
- Danin, A., Naenny, W., 2008. Contribution to the recognition of reeds by their rhizome anatomy. *Flora Mediterranea* 18, 385–392.
- Danin, A., Raus, T., Scholz, H., 2002. Contribution to the Flora of Greece: a new species of *Arundo* (Poaceae). *Willdenowia* 32, 191–194.
- Danton, P., Baffray, M., 1995. *Inventaire des plantes protégées en France*. Editions Nathan, Paris.
- Davis, J.I., Nixon, K.C., 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology* 41, 421–435.
- Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85, 407–415.

- Decruyenaere, J.G., Holt, J.S., 2005. Ramet demography of a clonal invader, *Arundo donax* (Poaceae), in Southern California. *Plant and Soil* 277, 41–52.
- Diamond, J., 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418, 700–707.
- Djamali, M., Akhiani, H., Andrieu-Ponel, V., Braconnot, P., Brewer, S., Beaulieu, J.-L. de, Fleitmann, D., Fleury, J., Gasse, F., Guibal, F., Jackson, S.T., Lézine, A.-M., Médail, F., Ponel, P., Roberts, N., Stevens, L., 2010. Indian summer monsoon variations could have affected the early-Holocene woodland expansion in the Near East. *The Holocene* 20, 813–820.
- Doyle, J.J., Flagel, L.E., Paterson, A.H., Rapp, R.A., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Wendel, J.F., 2008. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review of Genetics* 42, 443–461.
- Druez, F., Lhoyer, K., 2012. Espèce méditerranéenne menacée et aménagements urbains : le cas de la canne de Fréjus, *Arundo donaciformis* (Loisel.) Hardion et al. Master 2 SET - Bioeco Université P. Cézanne – Aix-Marseille.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4, e88.
- Dudley, T.L., 2000. *Arundo donax* L. Invasive plants of California's wildlands 53–58.
- Duval-Jouve, J., 1875. Histotaxie des feuilles de Graminées. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique* 6, 294-371.
- Ebach, M.C., Valdecasas, A.G., Wheeler, Q.D., 2011. Impediments to taxonomy and users of taxonomy: accessibility and impact evaluation. *Cladistics* 27, 550–557.
- Ehrlich, P.R., Holdren, J.P., 1971. Impact of population growth. *Science* 171, 1212–1217.
- Else, J.A., 1996. Post-flood establishment of native woody species and an exotic, *Arundo donax*, in a southern Californian riparian system. San Diego, University of San Diego.
- Escacré, J., Houssard, C., 1991. Changes in sex ratio in experimental populations of *Rumex acetosella*. *Journal of Ecology* 79, 379-387.
- Escarré, J., Houssard, C., Briane J.P., 1987. Evolution du rapport des sexes de populations de *Rumex acetosella* le long d'une succession postculturale. *Canadian Journal of Botany* 65, 2668-2675.
- Excoffon, P., Bonnet, S., 2013. Le rivage antique révélé par l'archéologie. In Dossier de l'archéologie HS n° 25. Pp 48-49.
- Fady, B., Lefèvre, F., Vendramin, G.G., Ambert, A., Régnier, C., Bariteau, M., 2008. Genetic consequences of past climate and human impact on eastern Mediterranean *Cedrus libani* forests. Implications for their conservation. *Conservation Genetics* 9, 85–95.
- Fauquette, S., Suc, J.-P., Jimenez-Moreno, G., Micheels, A., Jost, A., Favre, E., Bachiri-Aoufiq, N., Bertini, A., Clet-Pellerin, M., Diniz, F., Farjanel, G., Feddi, N., Zheng, Z., 2007. Latitudinal climatic gradients in the Western European and Mediterranean regions from the Mid-Miocene (c. 15 Ma) to the Mid-Pliocene (c. 3.5 Ma) as quantified from pollen data. *The Geological Society, London*, 481–502.
- Favarger, C., Contandriopoulos, J., 1961. Essai sur l'endémisme. *Bulletin de la Société Botanique Suisse*, 71 : 384-408.

- Fazey, I., Fischer, J., Lindenmayer, D.B., 2005. What do conservation biologists publish? *Biological Conservation* 124, 63–73.
- Fernandes, A., Queiros, M., 1969. Contribution à la connaissance cytotaxonomique des Spermaphytes du Portugal. I : Graminées. *Boletim Societad Broteriana* 43, 3-140.
- Fineschi, S., Cozzolino, S., Migliaccio, M., Vendramin, G.G., 2004. Genetic variation of relic tree species: the case of Mediterranean *Zelkova abelicea* (Lam.) Boisser and *Z. sicula* Di Pasquale, Garfi and Quézel (Ulmaceae). *Forest Ecology and Management* 197, 273–278.
- Fineschi, S., Turchini, D., Villani, F., Vendramin, G.G., 2000. Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries. *Molecular Ecology* 9, 1495–1503.
- Fiz-Palacios, O., Valcárcel, V., 2013. From Messinian crisis to Mediterranean climate: A temporal gap of diversification recovered from multiple plant phylogenies. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 15, 130–137.
- Fournier, P., 1946. Les quatre flores de France, Corse comprise. P. Chevalier édit., Paris.
- Gibbard, P.L., Head, M.J., Walker, M.J.C., 2010. Formal ratification of the Quaternary System/Period and the Pleistocene Series/Epoch with a base at 2.58 Ma. *Journal of Quaternary Science* 25, 96–102.
- Godfray, H.C.J., 2002. Challenges for taxonomy. *Nature* 417, 17–19.
- Godfray, H.C.J., Knapp, S., 2004. Introduction. *Phil Trans R Soc Lond B* 359, 559–569.
- Going, B.M., Dudley, T.L., 2008. Invasive riparian plant litter alters aquatic insect growth. *Biological Invasions* 10, 1041–1051.
- Gotelli, N.J., 2004. A taxonomic wish–list for community ecology. *Phil Trans R Soc Lond B* 359, 585–597.
- Govaerts, R., 1999. World checklist of seed plants. Volume 3, part 1, the species. Continental Publishing.
- Greuter, W., 1994. Extinctions in Mediterranean areas. *Phil Trans R Soc Lond B* 344, 41–46.
- Griffiths, H.I., Kryštufek, B., Reed, J.M., 2004. Late Pleistocene rodent dispersal in the Balkans, *in*: Griffiths, H.I., Kryštufek, B., Reed, J.M. (Eds.), *Balkan Biodiversity*. Springer Netherlands, pp. 135–145.
- Grime, J.P., 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist* 111, 1169–1194.
- Group, G.P.W., Barker, N.P., Clark, L.G., Davis, J.I., Duvall, M.R., Guala, G.F., Hsiao, C., Kellogg, E.A., Linder, H.P., 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the Grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88, 373–457.
- Grove, A.T., Rackham, O., 2003. *The Nature of Mediterranean Europe: an ecological history*. Yale University Press, New Haven.
- Hansen, D.L., Lambertini, C., Jampeetong, A., Brix, H., 2007. Clone-specific differences in *Phragmites australis*: Effects of ploidy level and geographic origin. *Aquatic Botany* 86, 269–279.
- Hanski, I., Gaggiotti, O.E., 2004. Metapopulation biology: past, present, and future. *Ecology, genetics, and evolution of metapopulations* 3–22.

- Hardion, L., Baumel, A., Dumas, P.J., Duong, N., Affre, L., Tatoni, T., 2010. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Astragalus tragacantha* L.(Fabaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA Internal transcribed spacers data (nrDNA ITS). *Ecologia Mediterranea* 36, 100.
- Hardion, L., Verlaque, R., Baumel, A., Juin, M., Vila, B., 2012a. Revised systematics of Mediterranean *Arundo* (Poaceae) based on AFLP fingerprints and morphology. *Taxon* 61, 1217–1226.
- Hardion, L., Verlaque, R., Callmander, M.W., Vila, B., 2012b. *Arundo micrantha* Lam. (Poaceae), the correct name for *Arundo mauritanica* Desf. and *Arundo mediterranea* Danin. *Candollea* 67, 131–135.
- Harrison, N., Harrison, R.J., 2011. On the evolutionary history of the domesticated apple. *Nature Genetics* 43, 1043–1044.
- Hebert, P.D.N., Gregory, T.R., 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54, 852–859.
- Hegarty, M., Hiscock, S., 2007. Polyploidy: doubling up for evolutionary success. *Current Biology* 17, R927–R929.
- Herrera, A.M., Dudley, T.L., 2003. Reduction of riparian arthropod abundance and diversity as a consequence of giant reed (*Arundo donax*) invasion. *Biological Invasions* 5, 167–177.
- Hewitt, G.M., 2011. Mediterranean Peninsulas: the evolution of hotspots, in: Zachos, F.E., Habel, J.C. (Eds.), *Biodiversity Hotspots*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 123–147.
- Hollingsworth, M.L., Bailey, J.P., 2000. Evidence for massive clonal growth in the invasive weed *Fallopia japonica*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133, 463–472.
- Holyński, R.B., 2010. Taxonomy and the mediocrity of DNA barcoding—some remarks on Packer *et al.*, 2009: DNA Barcoding and the mediocrity of morphology. *Arthropod Systematics and Phylogeny* 68, 143–150.
- Hooker, J.D., 1890. *The Flora of British India*. L. Reeve & Company.
- Hooker, S.W.J., 1864. *Species Filicum: Polypodieæ*. William Pamplin.
- Hsiao, C., Jacobs, S.W.L., Barker, N.P., Chatterton, N.J., 1998. A molecular phylogeny of the subfamily Arundinoideae based on sequences of rDNA. *Systematic Botany* 11, 41–52.
- Hu, G., Hawkins, J.S., Grover, C.E., Wendel, J.F., 2010. The history and disposition of transposable elements in polyploid *Gossypium*. *Genome* 53, 599–607.
- Huot, J., Bottéro, J., Margueron J-C., 1993. Mésopotamie, Berceau de la civilisation. *Historia Spécial* n° 24.
- Huxley, J., 1940. *The new systematics*. The Clarendon Press, Oxford.
- Ii, G.P.W.G., 2012. New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C4 origins. *New Phytologist* 193, 304–312.
- Imbert, S., 1992. Contribution à l'étude biosystématique et génétique d'un complexe polyploïde : *Brachypodium rupestre* sur la montagne de Lure. Mém. DEA. Université Aix-Marseille.
- Ingram, A.L., Christin, P.-A., Osborne, C.P., 2011. Molecular phylogenies disprove a hypothesized C4 reversion in *Eragrostis walteri* (Poaceae). *Annals of Botany* 107, 321–325.

- Isaac, N.J.B., Mallet, J., Mace, G.M., 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 464–469.
- Jiménez-Moreno, G., Fauquette, S., Suc, J-P., 2010. Miocene to Pliocene vegetation reconstruction and climate estimates in the Iberian Peninsula from pollen data. *Review of Palaeobotany and Palynology* 162, 403–415.
- Johnson, M., T. Dudley, *et al.* 2006. Seed production in *Arundo donax*? *Cal-IPC News* 14, 12-13.
- Joseph, L.N., Maloney, R.F., Possingham, H.P., 2009. Optimal allocation of resources among threatened species: a project prioritization protocol. *Conservation Biology* 23, 328–338.
- Sites Jr., J.W.S., Marshall, J.C., 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35, 199–227.
- Kareiva, P., Marvier, M., West, S., Hornisher, J., 2002. Slow-moving journals hinder conservation efforts. *Nature* 420, 15–15.
- Kattwinkel, M., Biedermann, R., Kleyer, M., 2011. Temporary conservation for urban biodiversity. *Biological Conservation* 144, 2335–2343.
- Khudamrongsawat, J., Tayyar, R., Holt, J.S., 2004. Genetic diversity of giant reed (*Arundo donax*) in the Santa Ana River, California. *Weed Science* 52, 395–405.
- Knapp, S., Bateman, R.M., Chalmers, N.R., Humphries, C.J., Rainbow, P.S., Smith, A.B., Taylor, P.D., Vane-Wright, R.I., Wilkinson, M., 2002. Taxonomy needs evolution, not revolution. *Nature* 419, 559–559.
- Knapp, S., Bohs, L., Nee, M., Spooner, D.M., 2004. Solanaceae — a model for linking genomics with biodiversity. *Comparative and Functional Genomics* 5, 285–291.
- Knapp, S., Vorontsova, M.S., Prohens, J., 2013. Wild Relatives of the eggplant (*Solanum melongena* L.: Solanaceae): new understanding of species names in a complex group. *PLoS ONE* 8, e57039.
- Knight, A.T., Cowling, R.M., Rouget, M., Balmford, A., Lombard, A.T., Campbell, B.M., 2008. 'Knowing' but not 'doing': Selecting priority conservation areas and the research-implementation gap. *Conservation Biology* 22, 610–617.
- Korotkova, N., Borsch, T., Quandt, D., Taylor, N.P., Müller, K.F., Barthlott, W., 2011. What does it take to resolve relationships and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (Cactaceae). *American Journal of Botany* 98, 1549–1572.
- Lambertini, C., Gustafsson, M.H.G., Frydenberg, J., Speranza, M., Brix, H., 2008. Genetic diversity patterns in *Phragmites australis* at the population, regional and continental scales. *Aquatic Botany* 88, 160–170.
- Le Roux, J.J., Wieczorek, A.M., Wright, M.G., Tran, C.T., 2007. Super-Genotype: global monoclonality defies the odds of nature. *PLoS ONE* 2, e590.
- Leitch, I.J., Bennett, M.D., 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82, 651–663.
- Levin, S.A., 1970. Community equilibria and stability, and an extension of the competitive exclusion principle. *American Naturalist* 413–423.

- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E., Christou, M., 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy* 25, 335–361.
- Lumaret, R., Borrill, M., 1988. Cytology, genetics, and evolution in the genus *Dactylis*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 7, 55–91.
- Mable, B.K., 2004. Polyploidy and self-compatibility: is there an association? *New Phytologist* 162, 803–811.
- Mace, G.M., 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Phil Trans R Soc Lond B* 359, 711–719.
- Mariani, C., Cabrini, R., Danin, A., Piffanelli, P., Fricano, A., Gomarasca, S., Dicandilo, M., Grassi, F., Soave, C., 2010. Origin, diffusion and reproduction of the giant reed (*Arundo donax* L.): a promising weedy energy crop. *Annals of Applied Biology* 157, 191–202.
- Martin-Lopez, B., Montes, C., Benayas, J., 2008. Economic Valuation of Biodiversity Conservation: the meaning of numbers. *Conservation Biology* 22, 624–635.
- Mascia, F., Fenu, G., Angius, R., Bacchetta, G., 2013. *Arundo micrantha*, a new reed species for Italy, threatened in the freshwater habitat by the congeneric invasive *A. donax*. *Plant Biosystems* 147, 1–13.
- Masterson, J., 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. *Science* 264, 421–423.
- McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Hawksworth, D.L., Marhold, K., 2006. International Code of botanical nomenclature (Vienna Code)-Adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna (Regnum Vegetabile, 146). Arg gantner Verlag Kg.
- Médail, F., 2005. Mise en place et évolution de la biodiversité: l'exemple de la flore méditerranéenne. Marty P., Vivien FD, Lepart J. & Larrère R. (coords.), *Les biodiversités: objets, théories, pratiques*, CNRS Éditions, Paris 97–112.
- Médail, F., Diadema, K., 2006. Biodiversité végétale méditerranéenne et anthropisation: approches macro et micro-régionales. *Annales de géographie* 651, 618–640.
- Médail, F., Quézel, P., 1997. Hot-Spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84, 112–127.
- Médail, F., Quézel, P., 1999. Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: setting global conservation priorities. *Conservation Biology* 13, 1510–1513.
- Médail, F., Verlaque, R., 1997. Ecological characteristics and rarity of endemic plants from southeast France and Corsica: Implications for biodiversity conservation. *Biological Conservation* 80, 269–281.
- Metrick, A., Weitzman, M.L., 1996. Patterns of behavior in endangered species preservation. *Land Economics* 72, 1.
- Miller, S.E., 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *PNAS* 104, 4775–4776.
- Naveh, Z., Dan, J., 1973. The Human degradation of mediterranean landscapes in Israel, in: Castri, F. di, Mooney, H.A. (Eds.), *Mediterranean type ecosystems*, Ecological Studies. Springer Berlin Heidelberg, pp. 373–390.
- Noble, V., Diadema, K., et coll., 2011. La flore des Alpes-Maritimes et de la principauté de Monaco : Originalité et diversité. Naturalia Publications, Turriers.

- Olivier, L., Galland, J.-C., Maurin, H., Roux, J.-P., 1995. Livre rouge de la flore menacée de France. Tome 1: Espèces prioritaires. Collection patrimoines naturels, Paris.
- Ortego, J., Bonal, R., Muñoz, A., 2010. Genetic consequences of habitat fragmentation in long-lived tree species: the case of the Mediterranean Holm Oak (*Quercus ilex* L.). *Journal of Heredity* 101, 717–726.
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., Hamner, R., 2009. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources* 9, 42–50.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M., 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7, 16.
- Padial, J.M., Riva, I.D. la, 2006. Taxonomic inflation and the stability of species lists: the perils of ostrich's behavior. *Systematic Biology* 55, 859–867.
- Palacios, C., González-Candelas, F., 1997a. Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology* 6, 1107–1121.
- Palacios, C., González-Candelas, F., 1997b. Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae) using RAPD markers. *Molecular Ecology* 6, 671–675.
- Parisod, C., Alix, K., Just, J., Petit, M., Sarilar, V., Mhiri, C., Ainouche, M., Chalhoub, B., Grandbastien, M.-A., 2010a. Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. *New Phytologist* 186, 37–45.
- Parisod, C., Holderegger, R., Brochmann, C., 2010b. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist* 186, 5–17.
- Pillon, Y., Chase, M.W., 2007. Taxonomic exaggeration and its effects on Orchid conservation. *Conservation Biology* 21, 263–265.
- Pizzolongo, P., 1962. Osservazione cariologiche su *Arundo donax* L. e *Arundo plinii* Turra. *Annali di Botanica (Rome)* 27, 173–188.
- Pons, A., Thinin, M., n.d. The role of fire from palaeoecological data. *Ecologia mediterranea* 13, 3–11.
- Poulin, J., Weller, S.G., Sakai, A.K., 2005. Genetic diversity does not affect the invasiveness of fountain grass (*Pennisetum setaceum*) in Arizona, California and Hawaii. *Diversity and Distributions* 11, 241–247.
- Prat, H., 1960. Vers une classification naturelle des Graminées. *Bulletin de la Société Botanique de France* 107, 32–79.
- Pullin, A.S., Knight, T.M., 2008. Effectiveness in conservation practice: Pointers from medicine and public health. *Conservation Biology* 15, 50–54.
- Pullin, A.S., Knight, T.M., Stone, D.A., Charman, K., 2004. Do conservation managers use scientific evidence to support their decision-making? *Biological Conservation* 119, 245–252.
- Queiroz, K. De, Donoghue, M.J., 1990. Phylogenetic systematics or Nelson's version of cladistics? *Cladistics* 6, 61–75.
- Queiroz, K.D., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56, 879–886.

- Quézel, P., 1995. La flore du bassin méditerranéen: origine, mise en place, endémisme. *Ecologia mediterranea* 21, 19–39.
- Quézel, P., Médail, F., 2003. *Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Elsevier Paris.
- Quinn, L.D., Holt, J.S., 2008. Ecological correlates of invasion by *Arundo donax* in three southern California riparian habitats. *Biological Invasions* 10, 591–601.
- Raunkiaer, C., 1934. *The life forms of plants and statistical plant geography*. The Clarendon Press, 632 pp.
- Raybould, A.F., Gray, A.J., Lawrence, M.J., Marshall, D.F., 1991. The evolution of *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Gramineae): origin and genetic variability. *Biological Journal of the Linnean Society* 43, 111–126.
- Reed, D.H., Frankham, R., 2003. Correlación entre adaptabilidad y diversidad genética. *Conservation Biology* 17, 230–237.
- Renvoize, S.A., 1981. The Sub-Family Arundinoideae and its position in relation to a general classification of the Gramineae. *Kew Bulletin* 36, 85–102.
- Renvoize, S.A., 1986. A survey of leaf-blade anatomy in Grasses VIII. Arundinoideae. *Kew Bulletin* 41, 323–338.
- Restani, M., Marzluff, J.M., 2001. Avian conservation under the endangered species act: expenditures versus recovery priorities. *Conservation Biology* 15, 1292–1299.
- Richards, A.J., 1997. *Plant breeding systems*. Taylor & Francis, Oxford.
- Roberts, N., Brayshaw, D., Kuzucuoglu, C., Perez, R., & Sadori, L., 2011a. The mid-Holocene climatic transition in the Mediterranean: Causes and consequences. *The Holocene* 21, 3–13.
- Roberts, N., Eastwood, W.J., Kuzucuoğlu, C., Fiorentino, G., Caracuta, V., 2011b. Climatic, vegetation and cultural change in the eastern Mediterranean during the mid-Holocene environmental transition. *The Holocene* 21, 147–162.
- Saltonstall, K., 2001. A set of primers for amplification of noncoding regions of chloroplast DNA in the Grasses. *Molecular Ecology Notes* 1, 76–78.
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., et al., 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635–641.
- Shantz, H.L., 1954. The place of grasslands in the Earth's cover. *Ecology* 35, 143–145.
- Sibly, R.M., Grime, J.P., 1986. Strategies of resource capture by plants—evidence for adversity selection. *Journal of theoretical biology* 118, 247–250.
- Simmons, A.H., 1988. Extinct pygmy hippopotamus and early man in Cyprus. *Nature* 333, 554–557.
- Simonet, M., 1932. Polyploïdie accompagnée de gigantisme chez les plantes horticoles. *Comptes rendus du Xème Congrès International d'Horticulture*, 1–12.
- Simpson, G., 1961. *Principles of animal taxonomy*. Columbia University Press, New York.
- Simpson, G.G., 1951. The species concept. *Evolution* 5, 285–298.
- Sites Jr, J.W., Marshall, J.C., 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 462–470.

- Sluys, R., Hazevoet, C.J., 1999. Pluralism in species concepts: dividing nature at its diverse joints. *Species diversity: an international journal for taxonomy, systematics, speciation, biogeography, and life history research of animals* 4, 243–256.
- Small, E., 1989. Systematics of Biological Systematics (Or, Taxonomy of Taxonomy). *Taxon* 38, 335–356.
- Stafleu, F., Cowan, R., 1986. *Taxonomic Literature* 6: 297-299.
- Stevens, P.F., 1984. Metaphors and typology in the development of botanical systematics 1690-1960, or the art of putting new wine in old bottles. *Taxon* 33, 169–211.
- Stevens, P.F., 2000. Botanical Systematics 1950-2000: Change, Progress, or Both? *Taxon* 49, 635–659.
- Suc, J.-P., 1984. Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. *Nature* 307, 429–432.
- Talon, B., Carcaillet, C., Thinon, M., 1998. Études pédoanthracologiques des variations de la limite supérieure des arbres au cours de l'Holocène dans les Alpes françaises. *Géographie physique et Quaternaire* 52, 195.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H., Vogler, A.P., 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 70–74.
- Team, R.D.C., 2013. R: A language and environment for statistical computing. ISBN 3-900051-07-0. R Foundation for Statistical Computing. Vienna.
- Valdecasas, A.G., Williams, D., Wheeler, Q.D., 2008. “Integrative taxonomy” then and now: a response to Dayrat (2005). *Biological Journal of the Linnean Society* 93, 211–216.
- Valsecchi, F., 1994. About the *Astragalus tragacantha* complex (Leguminosae) in the Mediterranean. *Webbia* 49, 31–41.
- Van Tieghem, P., 1897. Morphologie de l'embryon et de la plantule chez les Graminées et les Cyperacées. *Annales des Sciences naturelles, Botanique* 3, 259–309.
- Vandepoele, K., Simillion, C., Peer, y.v. de, 2003. Evidence that rice and other cereals are ancient aneuploids. *Plant Cell* 15, 2192–2202.
- Vavilov, N.I., 1935. Scientific bases of wheat breeding. Selkhozgiz, Moscow-Leningrad.
- Véla, E., Benhouhou, S., 2007. Évaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le Bassin Méditerranéen. *Comptes Rendus de Biologie* 330, 589–605.
- Vendramin, G.G., Fady, B., González-Martínez, S.C., Hu, F.S., Scotti, I., Sebastiani, F., Soto, Á., Petit, R.J., 2008. Genetically depauperate but widespread: the case of an emblematic Mediterranean Pine. *Evolution* 62, 680–688.
- Verlaque, R., Aboucaya, A., Fridlender, A., 2002. Les xénophytes envahissants en France: écologie, types biologiques et polyploïdie. *Botanica Helvetica* 112, 121–136.
- Verlaque, R., Etude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. III : Tribus des Knautieae et des Dipsaceae. *Revue de Cytologie et Biologie Végétale* 8, 171-243.
- Verlaque, R., Médail, F., Aboucaya, A., 2001. Valeur prédictive des types biologiques pour la conservation de la flore méditerranéenne. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Séries III - Sciences de la Vie* 324, 1157–1165.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. van de, Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuclear Acids Research* 23, 4407–4414.

- Walicki, F., 2008. Projet de plan de conservation de la canne de Pline sur le territoire de la commune de Fréjus. Fréjus, Service de l'environnement.
- Walicki, F., 2010. SIG Canne de Pline - Communauté d'agglomération de Fréjus-Saint-Raphaël.
- Walicki, F., 2013. Demande de dérogation pour l'enlèvement de spécimens d'espèce végétale protégée sur le territoire de la commune de Fréjus - Interaction entre la présence de spécimens de canne de Fréjus et l'aménagement d'un giratoire sur l'avenue André Léotard. Communauté d'agglomération Var-Estérel-Méditerranée.
- Weiss, H., Courty, M.A., Wetterstrom, W., Guichard, F., Senior, L., Meadow, R., Curnow, A., 1993. The genesis and collapse of third millennium north Mesopotamian Civilization. *Science* 261, 995–1004.
- Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J., Otto, S.P., 2008. The dynamic nature of apomixis in the Angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169, 169–182.
- Wijte, A.H.B.M., Mizutani, T., Motamed, E.R., Merryfield, M.L., Miller, Alexander, D.E., 2005. Temperature and endogenous factors cause seasonal patterns in rooting by stem fragments of the invasive giant reed, *Arundo donax* (Poaceae). *International Journal of Plant Sciences* 166, 507–517.
- Wiley, E.O., Mayden, R.L., 2000. The evolutionary species concept. In: Wheeler, Q. D.; Meier, R. (eds), *Species concepts and phylogenetic theory: A debate*. Columbia University Press, New York. pp. 70–89.
- Will, K.W., Mishler, B.D., Wheeler, Q.D., 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54, 844–851.
- Wilson, J.R., Procheş, Ş., Braschler, B., Dixon, E.S., Richardson, D.M., 2007. The (bio) diversity of science reflects the interests of society. *Frontiers in Ecology and the Environment* 5, 409–414.
- Wolfe, K.H., Sharp, P.M., Li, W.-H., 1989. Rates of synonymous substitution in plant nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution* 29, 208–211.
- Yannic, G., Baumel, A., Ainouche, M., 2004. Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* (Poaceae), a salt-marsh species in decline along the Western European Coast. *Heredity* 93, 182–188.
- Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E., 2012. *Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press, Oxford.

Evolution et systématique du genre *Arundo* L. (Poaceae), et conservation d'une endémique ligure: interactions Homme/Biodiversité en Méditerranée

Résumé : Depuis le Néolithique, les activités anthropiques ont fortement impacté la persistance et l'évolution des espèces méditerranéennes, avec des effets variés sur la biodiversité, notamment son érosion et son homogénéisation. Composé seulement de trois à cinq espèces, le genre méditerranéen et Sud-asiatique *Arundo* L. (Poaceae) illustre bien les interactions Homme-Biodiversité. Tout d'abord, l'imprécision des statuts taxonomiques pour la plupart de ces espèces dessert autant la conservation des populations françaises protégées d'*A. plinii* Turra *s.l.* que la lutte contre l'invasive mondiale *A. donax* L. Suite à la révision systématique du complexe circumméditerranéen *A. plinii* Turra *s.l.*, trois taxons ont été distingués, élevant les populations françaises au rang d'endémique ligure, *A. donaciformis* (Loisel.) Hardion *et al.* Cette dernière s'est différenciée en marge de son espèce-sœur, l'Italo-Balkanique *A. plinii s.s.*, sous les effets conjugués de la polyploïdie et des oscillations climatiques du Pléistocène. La forte clonalité du genre et la formation récente d'*A. donaciformis* ont réduit son potentiel adaptatif. Malgré une persistance ancienne au sein d'un paysage agricole, son actuelle position urbaine sur la Côte d'Azur la menace fortement. Enfin, l'origine perse d'*A. donax* et l'hypothèse de son statut d'archéophyte en Méditerranée illustre l'intérêt primordial de ce genre lors du développement des civilisations antiques.

Mots clés : clonalité, polyploïdie, conservation, Méditerranée, Asie, systématique, roseau

Systematics and evolution of the genus *Arundo* L. (Poaceae), and conservation of a ligurian endemic species: Human/Biodiversity interactions in the Mediterranean

Abstract: Human activities have scrambled biodiversity persistence and evolution of Mediterranean species since the Neolithic, inducing various impacts on biodiversity, from reduction to homogenisation. With only three to five species, the Mediterranean and South-Asian genus *Arundo* L. (Poaceae) well illustrate these Human-Biodiversity interactions. First, the taxonomic mess for almost all *Arundo* taxa harms the conservation of protected French populations of *A. plinii* Turra *s.l.* as much as the biological control of the worldwide invasive *A. donax* L. The systematic revision of the circum-Mediterranean *A. plinii* complex in three distinct taxa has distinguished French populations as a Ligurian endemic species, *A. donaciformis* (Loisel.) Hardion *et al.* This species was differentiated from its nearest relative, the italo-balkan *A. plinii s.s.*, under the coupled effects of polyploidy and Pleistocene climatic variations. The dominating clonality of the genus and the recent speciation of *A. donaciformis* have reduced its adaptive potential. Despite its ancient persistence under farmlands, its current urban position on the French Riviera threatens this protected species. Finally, the Persian origin of *A. donax* and its hypothetic status of archeophyte in the Mediterranean show the essential usefulness of this genus during the development of antic civilisations.

Keywords: clonality, polyploidy, conservation, Mediteranean, Asian, systematics, reed