

Verschillen in de zaadbanksamenstelling tussen oude en recent herstelde kalkgraslanden in de Viroinvalei.

Reinhardt STRUBBE

Promotor: Prof. Dr. Ir. Olivier Honnay

Begeleider: Kenny Helsen

Proefschrift ingediend tot het
behalen van de graad van
Master of Science in Biologie

Academiejaar 2012-2013

© Copyright by KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wend u tot de KU Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11 bus 2100, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

Dankwoord

Allereerst wil ik graag professor Olivier Honnay bedanken voor het beschikbaar stellen van deze thesis. Al van jongs af aan ben ik gefascineerd door de natuur. Ik ging reeds vele keren met de jeugdbond voor natuur en milieu (jnm) op kamp in de Viroinvallei, en ook uit eigen interesse kom ik hier geregeld om deze prachtige omgeving met zijn zeer uitgebreide flora en fauna te bewonderen. Ik ben hem daarom zeer dankbaar dat ik mijn thesis mocht doen betreffende dit prachtige studiegebied.

In het bijzonder wil ik mijn begeleider, Kenny Helsen, bedanken voor de hulp bij het uitvoeren van deze thesis. Zijn raad en verbeteringen bij het schrijven van deze thesis en bij de verwerking van de data waren zeer waardevol. Ook zijn enthousiasme voor en kennis van planten waren van groot nut. Sofie Meeus en Kasper van Acker wil ik graag bedanken voor hun hulp tijdens het veldwerk. Deze laatste persoon en professor Martin Hermy wil ik ook bedanken voor de hulp bij het determineren van bepaalde planten in de serre. Graag wil ik ook Eric Van Beek bedanken, zowel voor zijn raad voor het optimale gebruik van de serre, als bij het determineren van bepaalde kiemplanten.

Ook wil ik mijn kotgenoten en mijn vrienden, met in het bijzonder Gert en Gert, bedanken voor de gezamenlijke steun tijdens de thesisperiode. Een wekelijkse tot dagelijkse natuurtocht met hen zorgde voor een welkome ontspanning en kon inspiratie opdoen bij het schrijven aan deze thesis. Mijn vriendin Marian wil ik ook graag bedanken voor de steun tijdens de thesisperiode. Een nachtelijke bevertocht met haar was een welkome afwisseling op een nachtje aan de thesis werken.

Als laatste wil ik mijn moeder, Lea De Vriese, bedanken om met haar uitgebreide literaire kennis deze thesis na te lezen op taalfouten.

Reinhardt Strubbe, Mei 2013

Inhoudsopgave

1. Inleiding	p. 1
1.1 Kalkgraslanden	p. 1
1.2 Bedreiging van de kalkgraslanden.....	p. 4
1.3 Herstel van de graslanden.....	p. 8
1.4 De zaadbank	p. 10
1.5 Zaadbank en restauratie	p. 12
1.6 Plantenkenmerken en de zaadbank.....	p. 15
1.7 Zaadbank in de Viroinvallei	p. 16
1.8 Doelstellingen thesis	p. 17
2. Materiaal en methoden	p. 18
2.1 Studiegebied.....	p. 18
2.2 Staalname.....	p. 18
2.3 Voorbereiding van het kiemingsexperiment.....	p. 20
2.4 Het zaadbankexperiment	p. 20
2.5 Data-analyse.....	p. 21
2.5.1 Plantenkenmerken-analyse.....	p. 21
2.5.2 Zaadbankexperiment	p. 23
A. Effect van de bodemdiepte op de soortensamenstelling en het aantal zaden.....	p. 23
B. Zaadbankdiversiteit.....	p. 23
C. Zaadbank soortensamenstelling	p. 24
D. Zaadbank-differentiatie	p. 25
E. Gelijkenis vegetatie en zaadbank	p. 26
3. Resultaten	p. 27
3.1 Plantenkenmerken analyse	p. 27
3.2 Het zaadbankexperiment	p. 30
3.2.1 Verloop.....	p. 30
3.2.2 Zaadbankdiversiteit	p. 31
3.2.3 Zaadbank-soortensamenstelling.....	p. 33
3.2.4 Zaadbank-differentiatie.....	p. 38

3.2.5 Gelijkenis vegetatie en zaadbank.....	p. 38
4. Discussie	p. 39
4.1 plantenkenmerken analyse.....	p. 39
4.2 Zaadbank experiment.....	p. 40
4.2.1 Verloop.....	p. 40
4.2.2 Zaadbankdiversiteit en - soortensamenstelling.....	p. 43
4.2.3 Zaadbank-differentiatie.....	p. 46
4.2.4 Gelijkenis vegetatie en zaadbank.....	p. 47
4.2.5 Suggesties voor beheer en beleid.....	p. 48
4.2.6 Algemene bemerkingen en beperkingen.....	p. 50
4.2.7 Conclusie.....	p. 51
5. Samenvatting	p. 52
6. Summary	p. 53
7. Referenties	p. 55
8. Appendix	p. 65

1. Inleiding

1.1 Kalkgraslanden

Kalkgraslanden omvatten droge tot halfdroge voedselarme graslanden (Decleer, 2007) die voorkomen op basische tot neutrale substraten die geassocieerd zijn met kalk en/of krijtsteen (Silva *et al.*, 2008) of kalkrijke löss (WallisDeVries *et al.*, 2002). Binnen Europa zijn ze terug te vinden van Zuid-Scandinavië tot de Alpen en de Pyreneeën en van de westkust van Ierland tot het meest westelijke deel van Polen (Honnay *et al.*, 2004). Typisch aan dergelijke voedselarme bodems is dat ze ondiep zijn en ontstaan door verwerking van het onderliggende gesteente (Bossuyt *et al.*, 2006; Honnay *et al.*, 2004). De vegetatie is onafhankelijk van het grondwater voor de vochtvoorziening (Decleer, 2007).

Kalkgraslanden in Noord- en Centraal-Europa zijn voornamelijk halfnatuurlijke gemeenschappen die ontstonden nadat ca. 7000 jaar geleden grote delen van de oerbossen werden gekapt. Plantensoorten uit droge open habitats verzamelden zich op natuurlijke wijze en vormden soortenrijke graslanden, voornamelijk op droge kalkhoudende hellingen en plateaus (WallisDeVries *et al.*, 2002). Het maaien van weilanden voor het gebruik van hooi sinds de Romeinse tijd leverde waarschijnlijk ook een bijdrage aan de verdere expansie van de kalkgraslanden (Poschlod & WallisDeVries, 2002). Ook het gebruik van het drieslagstelsel sinds het eind van de vroege Middeleeuwen tot de 19^e - begin 20^e eeuw, droeg bij tot het ontstaan van kalkgraslanden. In dergelijk landbouwsysteem werd altijd gebruik gemaakt van één veld dat men liet begrazen (Poschlod & WallisDeVries, 2002). Door deze afwisseling van akker en weiland konden vele kalkgraslandsoorten doorheen Europa migreren. Open, net verlaten bodems zijn immers nodig voor een snelle, succesvolle vestiging (Hard, 1964; fide Poschlod & WallisDeVries, 2002). Het steeds populairder worden van graasbeheer met schapen sinds de 14^e en 15^e, maar vooral sinds de 18^e eeuw, zorgde verder voor de verspreiding van de kalkgraslandsoorten via zoöchorie en het voortbestaan van de kalkgraslanden (Poschlod & WallisDeVries, 2002; WallisDeVries *et al.*, 2002).

Zonder actief beheer door de mens zouden dergelijke habitats niet kunnen stand houden (Honnay *et al.*, 2004). Peet en Christensen (1988; fide Wilson *et al.*, 2012) wijten de hoge soortenrijkdom van kalkgraslanden dan ook aan de geregelde verstoring door maai-beheer, begrazingsbeheer of verstoring door vuur. Dit leidt tot een meer symmetrische competitie en een bijgevolg tragere competitieve exclusie tussen de plantensoorten. Onderzoek toonde aan dat een begrazingsregime de beste resultaten oplevert (Decleer, 2007; Kahmen *et al.*, 2002; Willems, 1983). Dit beheer resulteerde in de grootste soortendiversiteit van zowel zaadplanten als mossen. Ook een maai-beheer resulteerde in een hoge soortenrijkdom. Nulbeheer of afbranden zijn niet aan te raden gezien zij zorgen voor een shift in de

soortensamenstelling, met een daling van de soortenrijkdom tot gevolg (Kahmen *et al.*, 2002).

Wilson *et al.* (2012) toonde aan dat de hoogste soortenrijkdom ter wereld op grote schaal ($\geq 100 \text{ m}^2$) terug te vinden is in tropisch laagland regenwoud. Op kleine schaal ($\leq 50 \text{ m}^2$) bleek dit echter in semi-natuurlijke, oligo- tot mesotrofe graslanden uit regio's met een gematigd klimaat te zijn. Kalkgraslanden behoren met andere woorden tot de soortenrijkste habitats ter wereld op kleine schaal, waar tot 40 hogere plantensoorten per m^2 kunnen teruggevonden worden. Hieronder behoren vele kwetsbare soorten, zoals orchideeën (*Orchidaceae*) en gentianen (*Gentianaceae*) (Kull & Zobel, 1991). Dankzij deze rijkdom aan flora zijn kalkgraslanden een goed habitat voor vele diersoorten, voornamelijk dan ongewervelden (Decler, 2007). Van Swaay (2002) toonde bijvoorbeeld aan dat 48% van de endemische Europese vlindersoorten voorkomen op kalkgraslanden. Van de 71 bedreigde Europese soorten, bleek zelfs 52% voor te komen op kalkgraslanden.

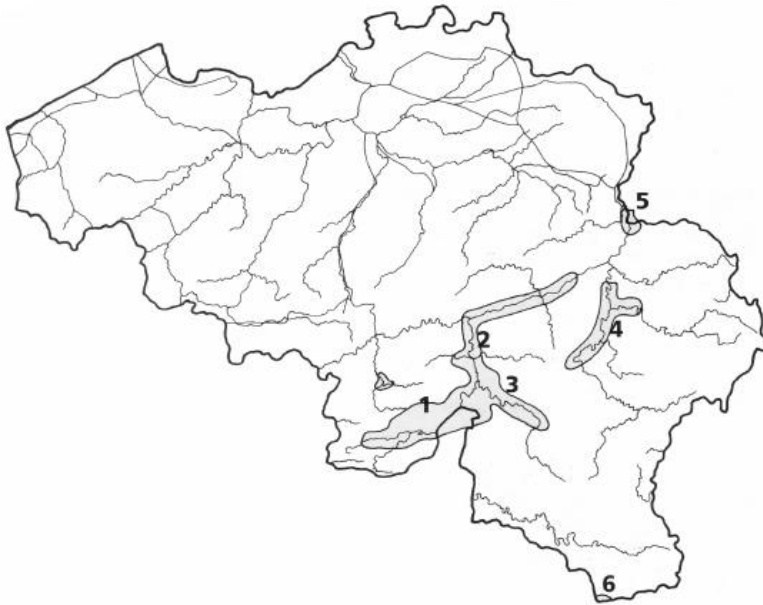
De klasse van de Europese kalkgraslanden (*Festuco-Brometea*) wordt opgedeeld in twee ordes, namelijk de steppe-achtige of subcontinentale graslanden (*Festucetalia valesiaca*) en de graslanden van meer oceanische en submediterrane regio's (*Brometalia erecti*). De *Festucetalia valesiaca* bevatten een overgangsvetatie tussen Centraal-Europese half-natuurlijke kalkgraslanden en Oost-Europese steppevegetatie en zijn dan ook grotendeels beperkt tot Oost- en Centraal-Europa. Deze orde wordt verder onderverdeeld in twee allianties. De eerste hiervan; *Festucion valesiaca* komt voor op de droogste bodems, en leunt dus het meeste aan bij de echte steppevegetaties. Deze vegetaties worden gekenmerkt door lijnvormige grassen van de genera *Festuca* en *Stipa* en verscheidene steppesoorten zoals bijvoorbeeld *Potentilla arenaria*, *Seseli hippomarathrum* en *Thymus pannonicus*. De tweede alliantie; de *Cirsio-Brachypodium* is kenmerkend voor iets vochtiger en diepere bodems en worden gedomineerd door *Brachypodium pinnatum* en *Bromus erectus*, aangevuld met een groot deel continentale soorten zoals bijvoorbeeld *Aster amellus*, *Chamaecytisus ratisbonensis* en *Inula ensifolia* (Ellenberg, 1988; W1).

De *Brometalia erecti* komen voornamelijk voor in West- en gedeeltelijk in Centraal-Europa en sluiten op vlak van soortensamenstelling meer aan bij submediterrane vegetaties en Zuid-Europese grasheides (Ellenberg, 1988). De orde van de *Brometalia erecti* worden verder opgedeeld in twee allianties; de extreem droge *xerobromion* graslanden en de vochtigere *mesobromion* graslanden (Calaciura & Spinelli, 2008). Het *xerobromion* wordt gekenmerkt door een vegetatiemat die frequent onderbroken wordt door rotsen en naakte bodem, terwijl ondergronds een dichte wortelkluw ontstaat. De bodem is zelden dieper dan 5cm. Dit resulteert uit erosieprocessen op de steile, meestal zuidelijk gerichte hellingen. Hier

heerst vaak een typisch warm, droog microklimaat, wat leidt tot de aanwezigheid van verschillende warmteminnende (submediterrane) soorten en soorten met specifieke aanpassingen aan deze extreme omstandigheden zoals bijvoorbeeld *Anthericum liliago*, *Globularia punctata* en *Teucrium chamaedrys* (Buttaye *et al.*, 2005). Het *mesobromion* komt voor op iets vochtigere locaties met wat diepere bodems. Hier vormt de vegetatie een relatief dichte grasmat gedomineerd door *Brachipodium pinnatum* en/of *Bromus erectus* met diverse kruidachtige soorten zoals bijvoorbeeld *Genista sagittalis*, *Helianthemum apenninum* en *Ononis repens* (Buttaye *et al.*, 2005; Decler, 2007).

De vier allianties binnen de *Festuco-Brometea* worden nog verder opgedeeld in verschillende gemeenschappen (Calaciura & Spinelli, 2008). Deze aflijning verschilt echter van land tot land. Voor België, en meer specifiek voor de kalkgraslanden in de Viroinvallei worden zeven gemeenschappen onderscheiden (Buttaye *et al.*, 2005). Drie behoren tot het *xerobromion*. Dit zijn de gemeenschap van Bosaardbei (*Fragaria vesca*) en Wolfskers (*Atropa belladonna*), de gemeenschap van Aardzegge (*Carex humilis*) en Bloedooievaarsbek (*Geranium sanguineum*) en de gemeenschap van Blauwgras (*Sesleria albicans*). De overige vier gemeenschappen behoren tot het *mesobromion*. Dit zijn de gemeenschap van Voorjaarsstijm (*Thymus praecox*) en Echte gamander (*Teucrium chamaedrys*), de gemeenschap van Ruige Leeuwentand (*Leontodon hispidus*) en Aarddistel (*Cirsium acaule*), de gemeenschap gedomineerd door Gevinde kortsteel (*Brachipodium pinnatum*) en de gemeenschap van Gewoon struisgras (*Agrostis capillaris*) en Brem (*Cytisus scoparius*).

In België zijn er grofweg zes gebieden waar kalkgraslanden voorkomen, namelijk de vallei van de Viroin, de vallei van de Maas, de valleien van de Lesse en Lomme, de valleien van de Ourthe en Aisne, de Sint-Pietersberg en het zuidelijke tipje van de Gaume (Fig. 1) (Honnay *et al.*, 2004). Dit werk beperkt zich tot de kalkgraslanden van de Viroinvallei, waar dieper op in zal gegaan worden in de materiaal en methoden sectie.

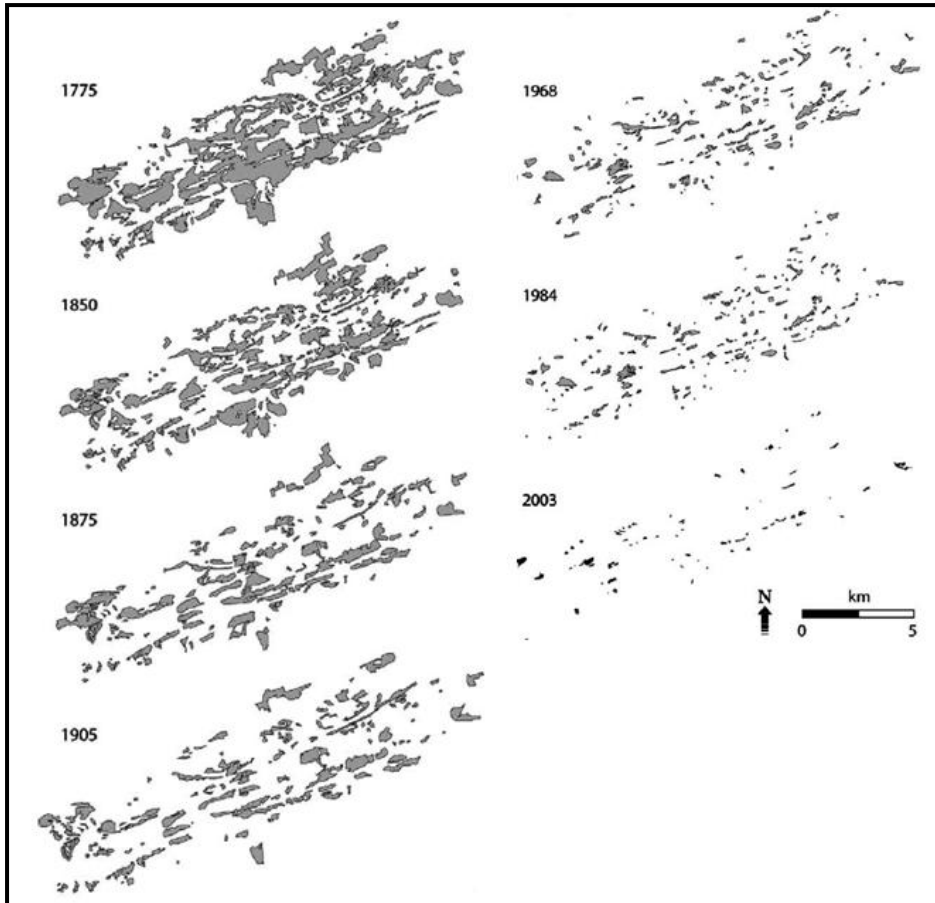


Figuur 1: Verspreiding van kalkgraslanden in België. Legende : 1. Vallei van de Viroin, 2. Vallei van de Maas, 3. Valleien van de Lesse en Lomme, 4. Valleien van de Ourthe en Aisne, 5. Sint-Pietersberg, 6. Regio van de Gaume (Uit Decocq *et al.*, 2004; fide Adriaens (2008)).

1.2 Bedreiging van de graslanden

Tot en met de eerste helft van de 19^e eeuw kwamen kalkgraslanden wijdverspreid voor over Europa. Sinds het einde van de 19^e eeuw echter, werd er een drastische mate van fragmentatie waargenomen. De waardevolle kalkgraslanden werden vervangen door landbouwgronden en plantages ten voordele van de bosbouw. Verder werden de traditionele begrazingssystemen achterwege gelaten, wat leidde tot spontane verbossing. Redenen voor het stopzetten van het begrazingssysteem waren onder andere de intensivering en mechanisatie van de landbouw, maar ook de ontwikkeling van de wolmarkt. Goedkope wol werd namelijk ingevoerd vanuit Australië en Nieuw-Zeeland, wat de vraag naar (duurdere) lokale wol deed instorten (Poschlod & WallisDeVries, 2002). Ook het feit dat andere textielstoffen dan wol op de markt kwamen zorgden mee voor een dalende belangstelling in een beheer met schapen (Bisteau & Mahy, 2005).

In de Viroin is dezelfde trend merkbaar. Halverwege de 20^e eeuw werden ook hier vele kalkgraslanden bebost met voornamelijk Grove den (*Pinus sylvestris*) en Zwarte den (*Pinus nigra*) (Honnay *et al.*, 2004). Ook het stopzetten van het traditionele maaibeheer en urbanisatie hebben bijgedragen tot het verlies van kalkgraslanden in de Viroin (Adriaens *et al.*, 2006). Door al deze effecten werd het aandeel van deze waardevolle gemeenschappen in de Viroinvallei gereduceerd van 3893,1 ha. in 1775 tot 73 ha. in 2002 (Fig. 2) (Adriaens, 2008). Nu zijn de kalkgraslanden als het ware geïsoleerde eilandjes in een matrix van bos en landbouwgrond (Adriaens *et al.*, 2006). Door restauratiewerken is het huidige areaal van kalkgraslanden in de Viroin opgelopen tot ongeveer 200 ha. (Delvingt, 2006).

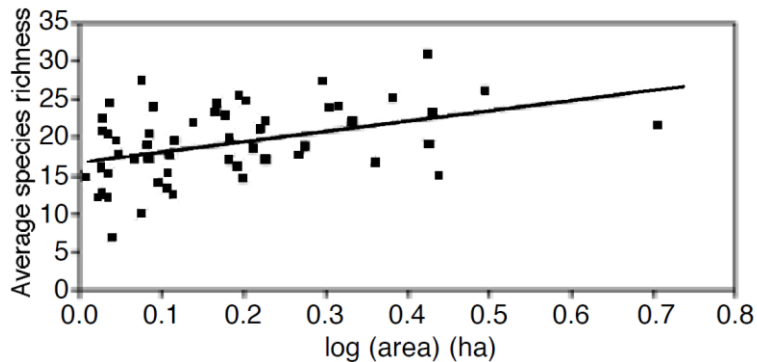


Figuur 2: Verandering in de omvang van de kalkgraslanden van de Viroin tussen 1775 en 2003 (Uit Adriaens *et al.*, 2006).

Vaak worden soorten-areaal curves gebruikt om de effecten op soortenrijkdom van fragmentatie te voorspellen (Butaye *et al.*, 2005). Deze geven het aantal soorten weer per oppervlakte-eenheid. De algemene trend is dat er een positief lineair verband bestaat tussen het aantal soorten en het logaritme van de grootte van het habitatfragment (Fig. 3). De meeste studies rapporteren dit patroon (Lomolino, 2001). In kleinere fragmenten zullen dus minder soorten kunnen voorkomen. Dit komt omdat kleinere fragmenten minder verscheidene habitats bevatten. Ook zullen de populaties in kleine fragmenten kleiner zijn en bijgevolg lijden onder densiteitafhankelijke stochastische extinctieprocessen (MacArthur & Wilson, 1967; fide Honnay *et al.*, 1999). Randeffecten hebben ook hun invloed op het soorten-areaal patroon. Dit zijn habitatrand afhankelijke veranderingen in het risico op mortaliteit doordat de habitatkwaliteit er lager is of predatie/concurrentie er groter is.

Meerdere kleine fragmenten hebben een groter aandeel aan randen dan één groot fragment, wat leidt tot een nog kleinere oppervlakte geschikt 'kern'habitat (Connor & McCoy, 2001). Het verdwijnen van soorten bij een afnemende fragmentgrootte volgens de soorten-areaal curve noemt men soortenrelaxatie. De soorten-areaal curve wordt gebruikt om deze verliezen in soortenaantallen door relaxatie te schatten (Gonzalez, 2000). Vaak

gebeurt het verlies van soorten na habitatverlies niet onmiddellijk, maar blijven de soorten nog een tijd aanwezig in de gemeenschap. In dit geval spreekt men van een extinctieschuld (zie verder).



Figuur 3: Soorten-areaal curve voor planten op de kalkgraslanden van de Viroin. De linker-as geeft het gemiddeld aantal soorten weer dat terug te vinden is, de rechter-as duidt op het logaritme van de grootte van het fragment (Uit Butaye *et al.*, 2005).

Ook de populaties zelf ondervinden schadelijke effecten van fragmentatie. Zoals eerder vermeld kunnen kleine habitatfragmenten enkel kleine populaties herbergen, dewelke zeer gevoelig zullen zijn aan extincties. Dit komt door de verminderde resistentie tegen stochastische gebeurtenissen dewelke typisch in kleine populaties voorkomen (Lande, 1988). Een dalende populatiegrootte kan eveneens leiden tot erosie van de genetische variatie en een grotere genetische differentiatie tussen populaties. Dergelijke lage niveaus van genetische variatie binnen een populatie kunnen op lange termijn de mogelijkheid om te reageren op omgevingsveranderingen via adaptatie en selectie limiteren. De verantwoordelijke factoren voor al deze negatieve effecten zijn genetische drift, inteelt en een verminderde *gene-flow* (Young *et al.*, 1996). Genetische drift is de willekeurige verandering in de allelenfrequentie doordat gameten die van de ene generatie op de andere worden overgedragen slechts een deel van de allelen bevatten die in de huidige populatie aanwezig zijn (Ellstrand & Elam, 1993). Logischerwijze zal dit een groter effect hebben op kleine populaties. Inteelt zal op zijn beurt leiden tot een lagere vruchtbaarheid, overleving en lagere groeisnelheden van de individuen. De oorzaak hiervan is een verhoogde homozygositeit voor zowel recessieve nadelige mutaties en voor allelen waarvan de loci een heterozygoot voordeel zouden hebben (Charlesworth & Willis, 2009). Door de verminderde *gene-flow* zal de homozygositeit in de populatie nog verder toenemen (Young *et al.*, 1996).

Gene flow draagt bij tot de zogenaamde *rescue effects*. Deze verzekeren dat soorten zelfs in kleine (maar goed verbonden) habitatfragmenten blijven voortbestaan als één grote metapopulatie in plaats van afzonderlijke kleine populaties. Bij een toenemende mate van isolatie (fragmentatie) zal deze gene flow tussen de habitatfragmenten echter verminderen

(Young *et al.*, 1996). Zo vond Honnay *et al.* (2007) dat geïsoleerde Kogelbloem (*Globularia bisnagarica*) populaties op bepaalde kalkgraslanden in de Viroin minder genetische diversiteit vertoonden. In minder geïsoleerde fragmenten is er dus meer *gene flow*. Uit onderzoek door Helm *et al.* (2009) dat op kalkgraslanden in Estland werd uitgevoerd bleek dat de genetische diversiteit van Bevertjes (*Briza media*), een habitatspecialist van kalkgraslanden, het best kon beschreven worden door de huidige connectiviteit van de graslanden. Hoe beter de kalkgraslanden in verbinding stonden met elkaar, hoe hoger de genetische diversiteit bleek te zijn.

Een mogelijk gevolg van fragmentatie is de zogenaamde 'extinctieschuld' (E: *extinction debt*). Deze term wordt gebruikt om situaties aan te duiden waarbij na habitatverlies de drempelwaarde om overleving te garanderen door sommige soorten niet meer gehaald is. Deze soorten zijn echter nog niet uitgestorven door hun trage respons op de omgevingsveranderingen. In de toekomst zullen deze soorten dus alsnog uitsterven (Tilman *et al.*, 2004). Indien met dergelijk fenomeen geen rekening wordt gehouden bij het inventariseren van het soortenaantal, kan dit leiden tot een overschatting van de soortenrijkdom op lange termijn. Dit leidt dan weer tot een onderschatting van hun eigenlijke bedreiging (Hanski & Ovaskainen, 2002). Uit een studie op gefragmenteerde graslanden van Cousins (2009) blijkt dat landschappen die nog meer dan tien procent van het oorspronkelijke grasland bevatten een extinctieschuld vertonen. Sterker gefragmenteerde landschappen, zoals deze van de Viroinvlei in België vertonen echter geen extinctieschuld (meer) (Adriaens *et al.*, 2006). Uit een studie van Piqueray *et al.* (2011) op kalkgraslanden in de vallei van de Lesse blijkt echter dat wel een extinctieschuld voorkomt in deze zeer sterk gefragmenteerde habitats. Als mogelijke verklaring geven de auteurs dat de onderzochte kalkgraslanden nog maar zeer recent sterk in grootte afnamen (vooral in de laatste 40 jaar). Hierdoor zou de extinctieschuld nog aanwezig zijn. Deze is het hoogst voor habitatspecialisten. Dergelijke planten met kleine populatieaantallen hebben volgens de auteurs grotere habitatfragmenten nodig. Soorten kunnen dus snel verdwijnen bij sterk doorgedreven fragmentatie. Een gepast beheer streeft bijgevolg naar het herstel van een aaneengesloten netwerk van kalkgraslanden.

Fragmentatie kan ook leiden tot niet-genetische effecten. Door de hoge graad van isolatie is er nauwelijks nog uitwisseling van zaden en pollen tussen de aanwezige populaties van verscheidene soorten. Deze uitwisseling is echter nodig om de overleving van kleine populaties te garanderen (Honnay *et al.*, 2004). Wel zou het gebruik van schapenkuddes bij het beheer deze uitwisseling van zaden positief beïnvloeden. Zo blijkt uit een studie op populaties van Wondklaver (*Anthyllis vulneraria*) in de Viroin dat deze weinig effecten ondervinden van fragmentatie. Dit komt waarschijnlijk door het transport van zaden via

schapenkuddes. Het gebruik van een graasbeheer zal dus niet enkel de habitatkwaliteit verbeteren, maar zal ook de genetische gevolgen van habitatfragmentatie tegengaan (Honnay *et al.*, 2006). Ook Fischer *et al.* (1996) bevestigden de rol van schapen in de verspreiding van zaden (en dieren) in kalkgraslanden.

Het Allee effect (de positieve relatie tussen fitness en populatieaantallen/densiteit) kan in deze context ook vermeld worden. Bij vele soorten ondervinden individuen uit populaties die sterk in populatieaantal dalen een verminderde levensvatbaarheid en reproductie omwille van niet-genetische redenen. Meestal is er een drempelwaarde van densiteit of aantal individuen waaronder de populatie zich niet kan herstellen (Allee *et al.*, 1949; fide Lande, 1988). Allee effecten bij planten zijn gekoppeld aan pollenlimitatie. Kleine populaties van planten zijn immers minder aantrekkelijk voor pollinatoren. De lagere aanwezigheid van deze pollinatoren zal leiden tot een kleinere kans dat zelf-incompatibele planten bevrucht zullen worden. Ook zal de kans dat pollen via windbestuiving terecht komen op stigma's van andere planten afnemen in kleine populaties (Courchamp *et al.*, 2008).

Een andere bedreiging voor kalkgraslanden is verruiging. Dit fenomeen vindt plaats door het stopzetten van het beheer in combinatie met de verhoogde influx van stikstof via de lucht (Van den Berg *et al.*, 2010). Hierdoor zullen competitief sterkere soorten zoals Gevinde kortsteel (*Brachypodium pinnatum*) en Bergdravik (*Bromus erectus*) sterk in aandeel toenemen. Als gevolg hiervan zullen vele andere plantensoorten niet langer kunnen blijven voortbestaan op het grasland (Adriaens *et al.*, 2006; Bobbink & Willems, 1987; Poschlod & WallisDeVries, 2002). Onder andere een versterkte competitie voor licht draagt bij aan het verlies van kalkgraslandsoorten (Jacquemyn *et al.*, 2003). Ook de enorme strooiselproductie van Gevinde kortsteel en Bergdravik verhindert de kieming van andere soorten (Bobbink & Willems, 1987). Ook overmatige betreding en het selectief inzamelen van zeldzame plantensoorten (bijvoorbeeld orchideeën) door de mens wordt als een bedreiging voor de kalkgraslanden gezien (Decler, 2007).

1.3 Herstel van de graslanden

In 1992 werd door de Europese Unie de habitatrichtlijn opgesteld. Deze is gericht op het waarborgen van de biologische diversiteit door het in stand houden van de natuurlijke habitats en de wilde flora en fauna in de lidstaten van de Europese Unie (W2). In de richtlijn wordt aangegeven voor welke types natuurlijke habitats en voor welke soorten er met het oog op hun instandhouding speciale beschermingszones moeten worden aangewezen (W3). Ook de 'halfnatuurlijke droge graslanden en struikvormende facies op kalkhoudende bodems', of *Festuco-Brometalia* (H6210) vallen onder deze habitattypes. Ze worden opgenomen door hun grote rijkdom aan orchideeën (Calaciura & Spinelli, 2008). Het herstel

en beheer van habitattypes in de Europese Unie opgenomen in de habitatrichtlijn worden gesubsidieerd door het LIFE programma. Dit werd in 1992 opgericht door de Europese Unie en is het financieringsinstrument voor milieubescherming en natuurbehoud binnen de EU. Sinds de oprichting heeft LIFE 3708 projecten medegefinancierd, voor een bedrag van 2,8 miljard euro (W4).

Onder andere in België, Duitsland, Finland, Frankrijk en vijf andere Europese landen wordt het herstel van kalkgraslanden (*Festuco-Brometalia*) gesponsord door het LIFE programma (Tabel 1). Grondgebied wordt aangekocht en overeenkomsten worden gesloten met landeigenaars. Ook worden struiken en voornamelijk naaldhoutplantages verwijderd van vroegere kalkgraslanden. Veelal wordt gebruik gemaakt van een begrazingsbeheer door schapen of een mechanisch maai-beheer (Silva *et al.*, 2008). In België bijvoorbeeld loopt momenteel het LIFE *Hélianthème* project (genoemd naar het Geel zonneroosje). Dit project heeft als doel kalkgraslanden, gelegen binnen het Natura 2000 netwerk van de Beneden-Maas, te herstellen. Ongeveer 150 ha. grasland zal men proberen te restaureren. Het project loopt nog tot 2014 (W5).

Tabel 1: Voorbeelden van enkele LIFE projecten betreffende de restauratie van kalkgraslanden in Europese landen (W4).

Land	Naam LIFE project	Periode van project
België	<i>Priority actions for grasslands and meadows in Southern Lorraine and the Ardenne</i>	2012-2019
	<i>Dry calcareous and rupicolous grasslands of lower and middle valleys of the Meuse basin</i>	2009-2014
Duitsland	<i>Dry, calcareous habitats in the cultural landscape of Höxter</i>	2011-2016
	<i>Restoration and conservation of xeric grasslands in Germany (Rheinland-Pfalz)</i>	2002-2006
Finland	<i>Species-rich LIFE - Improving the Conservation Status of Species-rich Habitats</i>	2011-2016
Frankrijk	<i>Nature and territories in the Rhône-Alpes Region</i>	2004-2008
	<i>The management of the xerothermic habitats of the North Harth</i>	1999-2004
Ierland	<i>Farming for conservation in the Burren</i>	2004-2010
Italië	<i>Petrifying springs and seminatural dry grasslands in Valle S. Croce e Valle del Curone</i>	2001-2004
	<i>Restoration and conservation of dry grasslands in southern and central Italy</i>	2011-2014
Portugal	<i>Management and conservation of the sites of S. Mamede and Nisa/Laje de Prata</i>	2004-2009
	<i>Conservation of Natural and Semi-natural Habitats in the "Serras de Aire e Candeeiros"</i>	2011-2014
Roemenië	<i>Tarnava Mare SCI: Saving Transylvania's Important Pastoral Ecosystems</i>	2010-2013
Slovenië	<i>Management plan and urgent actions for Veternik and Oslica high dry meadows</i>	2001-2003

Ook het herstel van de kalkgraslanden in de Viroin steunt voornamelijk op het LIFE project. LIFE Viroin behoort tot het project '*Restoration and sustainable management of upper Meuse dry grasslands*'. Het project werd uitgevoerd tussen 2002 en 2006, waarbij de voornaamste taak het verwijderen en afvoeren van bomen en struiken was. Alle doelstellingen van het project werden bereikt (Delvingt, 2006). Momenteel wordt ongeveer 165 ha. beheerd via extensieve begrazing, waaronder twee kuddes schapen en één kudde geiten, in het totaal bestaande uit 300 dieren (Silva *et al.*, 2008). Dit houdt een rotationeel begrazingsbeheer in, waaronder 1/3 van de beheerde fragmenten elk jaar intensief begraasd worden voor twee tot drie weken (Honnay *et al.*, 2006). Dankzij al deze maatregelen is het

aandeel aan kalkgraslanden duidelijk gestegen. Ook de connectiviteit en kwaliteit van de kalkgraslanden, alsook de mobiliteit en populatiegrootte van doelsoorten is verbeterd (Silva *et al.*, 2008).

1.4 De zaadbank

Een zaadbank is een reservoir van levensvatbare zaden van verschillende plantensoorten in de bodem (Thompson & Grime, 1979). Volgens Baker (1989; fide Christoffoleti & Caetano, 1998) bevat dit reservoir zaden die nog niet gekiemd zijn, maar die het potentieel bevatten om de huidige vegetatie te vervangen. Ze is vaak een weerspiegeling van de vroeger aanwezige vegetatie, en bevat soorten die door bepaalde omstandigheden, zoals verstoring, deel kunnen uitmaken van de toekomstige plantengemeenschap (Davies & Waite, 1998). Het aanleggen van een zaadbank, stelt soorten in staat om tijdelijk ongunstige condities voor kieming en vestiging te vermijden. Zo wordt het risico om op het verkeerde moment te kiemen verspreid in de tijd en wordt de populatiegenetische variatie over lange termijn bewaard (E: *bet-hedging*) (Bossuyt & Honnay, 2008a).

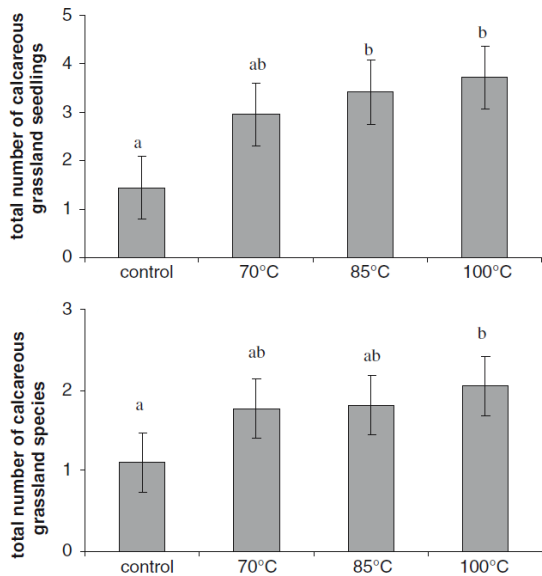
De levensduur van de zaden in de zaadbank verschilt van soort tot soort en zelfs binnen een bepaalde soort lopen de schattingen hiervan vaak sterk uit elkaar (Piessens *et al.*, 2005). Hiervoor werd door Bekker *et al.* (1998) de *Seed Longevity Index* (L) gedefinieerd. Deze index wordt berekend op basis van het aantal keer dat een soort als transiënt (T: zaden overleven minder dan 1 jaar in de bodem), korte-termijn persistent (SP: zaden blijven minimum 1 jaar, maar minder dan 5 jaar kiemkrachtig in de bodem) of lange-termijn persistent (LP: zaden blijven minimum 5 jaar kiemkrachtig in de bodem) voorkomt in de databank van Thompson *et al.* (1997), een databank die voor heel West-Europa de gegevens uit alle zaadbankstudies groepeerd (1189 planten soorten). Het berekenen van de index gaat als volgt: $L = (SP + LP) / (T + SP + LP)$. De index varieert tussen 0 en 1, waarbij soorten met een lage waarde soorten zijn waarvan de zaden geen tot slechts een kleine zaadbank opbouwen. Soorten met een hogere waarde hebben zaden die langer zullen overleven in de zaadbank (Bekker *et al.*, 1998). Een zaadbank bestaat dus uit zaden die korte of lange tijd kiemkrachtig blijven. De kiemkracht van zaden in de bodem neemt af met de tijd. Ook is er een deel van de zaden dat rot, gepredeerd wordt door bijvoorbeeld regenwormen en kevers of afsterft (Hermy *et al.*, 2004).

Veel soorten zorgen ervoor dat hun zaden in de zaadbank terecht komen door een dormantie op te leggen, die voorkomt dat ze meteen na de zaadzet kiemen. Een dormant zaad is een zaad dat gedurende een zekere periode niet de capaciteit heeft om te kiemen onder (tijdelijk) gunstige omstandigheden (temperatuur, licht,...) (Baskin & Baskin, 2004). Het fenomeen wordt beschouwd als een mechanisme om korte periodes van gunstige

omstandigheden voor kieming te overbruggen (Vleeshouwers *et al.*, 1995). Indien deze gunstige condities maar van korte duur zullen zijn, zal de plant immers niet kunnen overleven. Baskin en Baskin (2004) onderscheiden drie types van dormantie. Morfologische dormantie houdt in dat het embryo in het zaad nog niet volgroeid is wanneer het de plant verlaat. Er is dus nog een periode van groei en differentiatie nodig voordat de kieming kan plaatsvinden. Bij fysische dormantie is het zaad omhuld door een impermeabel omhulsel. Het embryo zal zich pas verder ontwikkelen indien er een opening in dit omhulsel ontstaat, waardoor water de ontwikkeling zal stimuleren. Dit kan gebeuren via een chemisch (bijvoorbeeld vertering van de zaadhuid in het spijsverteringsstelsel van vogels) of een mechanisch proces (bijvoorbeeld verlaagde weerstand tegen doorbreken van de radricula). Fysiologische dormantie ten slotte is gerelateerd aan een fysiologisch inhibitie mechanisme. Dit is de meest voorkomende vorm in de zaadbanken van gematigde regio's. Factoren die aanzet geven tot het breken van fysiologische dormantie in de natuur zijn veelal seizoensgerelateerd (voornamelijk temperatuur). Deze vorm van dormantie zal dus voornamelijk gebroken worden door hogere of lagere temperaturen, afhankelijk van de soort. Zo zal kieming plaatsvinden in het juiste seizoen (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). In een zaadbankonderzoek moet men dus rekening houden met dormantie. Bepaalde behandelingen moeten worden uitgevoerd om deze te breken, anders zullen vele planten dus over het hoofd worden gezien (Bossuyt & Honnay, 2008b).

De meeste zaden van graslandplanten die in de lente ontkiemen en die een jaarlijkse dormantiecycle vertonen kunnen niet kiemen in de zomer. De zaden van dergelijke plantensoorten moeten eerst aan een koudebehandeling onderworpen worden (Milberg, 1993). Bossuyt *et al.* (2006) vond dat ongeveer één vijfde van het totaal aantal kiemplanten kiemde na een koudebehandeling betreffende de zaadbank van kalkgraslanden uit de Viroin.

Ook een warmtebehandeling (E: *heat shock*) kan belangrijk zijn voor het kiemen van kalkgraslandsoorten. Zoals eerder aangehaald zijn vele van deze plantensoorten afkomstig uit (sub)mediterrane regio's. Soorten die voorkomen in gebieden waar vaak branden voorkomen (zoals de mediterrane regio's) zijn veelal aangepast aan het vuur. In het milieu na de brandhaard zal er immers veel minder competitie zijn, en zullen er ook meer nutriënten beschikbaar zijn (Jutila & Grace, 2002). Voor planten die zich hieraan hebben aangepast zal hitte dus een vereiste zijn voor het kiemen. Onderzoek in de Viroin toonde aan dat het aantal soorten en zaailingen van kalkgraslandspecialisten significant hoger was bij de verhitte dan bij de controle stalen. Het aantal zaailingen dat uitkwam stijgt samen met oplopende hitte (70-85-100°C). De letale grens voor de kieming ligt dus zelf nog over de 100 °C voor bepaalde kalkgrasland planten (Bossuyt & Honnay, 2008b) (Fig. 4).



Figuur 4: Het totaal aantal uitgekomen zaailingen van kalkgraslandspecialisten (boven) en totaal aantal uitgekomen kalkgraslandsoorten (onder) bij verschillende hittebehandelingen. Significante verschillen tussen verscheidene behandelingen worden aangegeven door verschillende letters (Uit Bossuyt & Honnay, 2008b).

1.5 Zaadbank en restauratie

De zaadbank is als het ware het ‘geheugen’ van de vroegere vegetatie. Hierdoor kan men er dus gebruik van maken om een vroegere vegetatie te herstellen. Omwille van deze reden wordt in de restauratie-ecologie vaak de focus gelegd op zaadbankdynamieken. Indien een soort niet aanwezig is in de persistente zaadbank, kan een plant de herstellende vegetatie enkel bereiken via kolonisatie van buitenaf (bv. via wind, dieren,...) (Bakker *et al.*, 1996).

Grime (1977) beschreef drie primaire plantenstrategieën. De competitieve strategie komt voor in productieve, relatief onverstoorde habitats; de stresstolerante strategie is geassocieerd met continue onproductieve condities en de ruderaal strategie is kenmerkend voor sterk verstoorde, maar potentieel productieve habitats. In de habitats waar herhaaldelijke periodes van verstoring voorkomen hebben soorten baat bij het produceren van een groot aantal langlevende zaden, die wachten op gunstige kiemingscondities. Dit zijn dus de ruderaal soorten. De andere twee strategieën steken echter minder energie in de productie van zaden. Competitieven leggen echter ook wel een (minder) persistente zaadbank aan, terwijl stresstolerante soorten voornamelijk een zaailingenbank aanleggen (Grime, 1977). Uit een meta-analyse van Bossuyt en Hermy (2003) die studies omtrent de restauratie van heide- en graslandgemeenschappen vanuit de zaadbank bekeek, blijkt dat de zaaddensiteit daalt nadat het beheer wegvalt. Dit proces gaat veel sneller bij graslandgemeenschappen dan bij heidegemeenschappen.

De soorten die het meest bijdragen tot de zaadbank van graslanden zijn eerder soorten van heides, nutriëntarme graslanden en landbouwgrond (Bossuyt & Honnay, 2008a). Zo vonden Bobbink en Willems (1993) dat na een maaibeheer van een kalkgrasland dat gedomineerd was door Gevinde kortsteel het aantal kortlevende planten met een persistente zaadbank (ruderalen) sterk in aandeel toenam (Bobbink & Willems, 1993). Deze zullen dus profiteren van de voordelige lichtcondities en massaal kiemen. Een groot aantal graslandspecialisten hebben echter geen zaden die voor een lange tijd bewaard kunnen blijven, omdat dit weinig voordeel biedt in deze stabiele plantengemeenschap (Bossuyt & Honnay, 2008a). Restauratie van soortenrijke graslanden kan volgens Bossuyt en Hermy (2003) dus niet steunen op de zaadbank. Deze gebrekkige zaadbank is nog een reden te meer waarom deze waardevolle gemeenschappen te lijden hebben onder habitatfragmentatie. Honnay *et al.* (2008) stellen immers dat een persistente zaadbank de gevolgen van habitatfragmentatie kan tegengaan. Wel zou men bij de interpretatie van dergelijke resultaten rekening moeten houden met *sampling* effecten. Men moet genoeg staalnamen nemen om een betrouwbare vertegenwoordiging van de zaadbank te bekomen. Van vele soorten zit immers maar een beperkt aantal zaden in de bodem.

Een klein aantal soorten zal dus meestal de zaadbank domineren (Bossuyt & Honnay, 2008a). Volgens Van Beek *et al.* (2004) zijn tien boringen per kwadrant en tien kwadranten per site het absolute minimum om een degelijk onderzoek uit te voeren. Bij een te kleine staalname kunnen dergelijke zaden dus over het hoofd gezien worden. Dit kan leiden tot een onderschatting van het soortenaantal en van het restauratiepotentieel. Plue *et al.* (2010a) vond een ruimtelijke clustering van zaden in de zaadbank van bossen. De auteurs stellen dan ook dat genoeg plots moeten genomen worden om deze effecten op kleine schaal te kunnen ontdekken. Het nemen van enkele grote plots zou deze ruimtelijke clustering mogelijk niet kunnen ontdekken. Het gebruik van vele kleinere plots wordt dus eerder aangeraden door de auteurs. Mogelijk is er op de kalkgraslanden van de Viroin ook dergelijke clustering van zaden aanwezig. In deze thesis werd daarom een groot aantal staalnamen genomen (zie sectie materiaal en methoden).

Gemeenschapontbinding (E: *community disassembly*) is het niet-random proces waarbij, binnen een gemeenschap, soorten verloren gaan en de populatiegroottes van bepaalde soorten afnemen (Zavaleta *et al.*, 2009). Gemeenschapsmontage (E: *community assembly*) daarentegen is het proces waarbij soorten een gemeenschap vormen door middel van kolonisatie vanuit een regionale 'bron' (HilleRisLambers *et al.*, 2012). Onder andere habitatfragmentatie, klimaatsverandering en het voorkomen van invasieve soorten leiden tot een hoge gevoeligheid aan ontbinding (E: *disassembly*). Doordat niet alle soorten even gevoelig zijn aan deze processen leidt dit tot een verandering van de

gemeenschapssamenstelling en tot veranderingen in het ecosysteemfunctioneren (Zavaleta *et al.*, 2009). Royo en Ristau (2012) suggereren dat deze definitie ook toepasbaar is op zaadbanken in de jaren na verstoring. Veranderingen in zaadbankdiversiteit worden sterk beïnvloed door de langlevendheid van de zaden van de verscheidene soorten in de zaadbank. De auteurs vonden dat de soortensamenstelling na verloop van tijd overgaat tot een beperkte set van soorten met de langste zaadlanglevendheden. De zaadbank zal dus convergeren (het verschil in soortensamenstelling daalt) met de tijd, doordat transiënte zaden zullen verdwijnen (Plue *et al.*, 2010a). Soorten uit latere successionele stadia zullen ook over het algemeen minder zaden produceren, dewelke een transiënte zaadbank vormen (Thompson *et al.*, 1998). De vegetatie zal echter een ander proces ondervinden. Nadat kalkgraslanden gerestaureerd werden zal geen convergentie van de soortensamenstelling plaatsvinden, met in sommige gevallen zelfs een divergentie in soortensamenstelling (Fukami *et al.*, 2005; Helsen *et al.*, 2012).

De mogelijkheid tot restauratie van kalkgraslanden hangt af van de aanwezigheid van bronnen van nieuwe zaadinput in de buurt en van de zaadbank (Bakker, 1989; fide Bobbink & Willems, 1993). Door de isolatie van vele kalkgraslanden hangt hun restauratie echter sterk af van regeneratie vanuit de zaadbank (Bobbink & Willems, 1993). Wagner *et al.* (2003) vond dat de gelijkenis tussen vegetatie en zaadbank daalde met de tijd sinds verlaten van het grasland. Dit kan verklaard worden door een convergentie van de zaadbanksamenstelling en een mogelijke divergentie van de vegetatiesamenstelling. Enkel in recent verlaten kalkgraslanden kan de zaadbank dus een rol spelen in de restauratie (Wagner *et al.*, 2003). Fagan *et al.* (2009) vond een groter verschil tussen de zaadbank en de vegetatie in oude (altijd al kalkgrasland) kalkgraslanden in vergelijking met gerestaureerde kalkgraslanden. Dit wijten de auteurs aan de transiënte aard van de zaadbank van vele kalkgraslandspecialisten (dewelke meer voorkomen op oude kalkgraslanden). De zaadbank en de vegetatie van de gerestaureerde kalkgraslanden bleken echter significant meer gelijkend te zijn. Dit verklaren de onderzoekers door het grote aandeel aan generalisten en therofyten, dewelke zeer veel zaden produceren. Er heeft zich hier dus nog geen convergentie van de zaadbank plaatsgevonden door de recente aard ervan.

Uit een studie van Kalamees en Zobel (1997) blijkt dat in de zaadbank van kalkgraslanden meer transiënte zaden voorkomen dan in deze van voormalige kalkgraslanden waarop dennenbossen aangeplant zijn. De zaaddensiteit was significant hoger in de bossen, en lager in de graslanden. Waarschijnlijk komt dit door betere kiemingscondities in de goed belichte gemeenschappen. De hogere accumulatie van zaden in overgroeide kalkgraslanden kan namelijk te wijten zijn aan dormantie geïnduceerd door schaduw van de bomen of door de dikkere humuslaag in het bos. Op basis hiervan kan men dus verwachten dat meer zaden

zullen kiemen in een open grasland met een lage kruidenlaag. De zaadbank van voormalige kalkgraslanden waarop jonge dennenbestanden staan kan dus een rol spelen in de restauratie van kalkgraslanden (Kalamees & Zobel, 1997). Uit een recente studie van Kalamees *et al.* (2012) betreffende de zaadbank van kalkgraslanden in Estland blijkt bovendien dat er 25 en 50 jaar na het verlaten van het beheer van deze graslanden zich nog enorm veel zaden van specialistische soorten in de zaadbank bevinden. Volgens deze auteurs kan de zaadbank van kalkgraslanden dus wel degelijk een rol spelen bij het herstel van verlaten kalkgraslanden.

Zaadbanken kunnen ook gebruikt worden om de genetische diversiteit te herstellen van populaties die lijden onder genetische erosie van soorten die nog niet verdwenen zijn. Als de zaadbank de genetische variatie van oude generaties bevat kan kieming van deze zaden helpen om de verloren genetische diversiteit te herstellen en zo eventuele extinctieschuld te bufferen (Templeton & Levin, 1979). Als de zaadbank ontstaat in kleine populaties waar inteelt veel voorkomt, dan kunnen deze zaden echter een lage fitness hebben (Aparicio & Guisande, 1997; Uesugi *et al.*, 2007).

Er is meer onderzoek nodig naar de levensgeschiedenissenkenmerken (E: *life history traits*) om te begrijpen waarom slechts enkele plantengenera de zaadbank domineren over een groot aandeel van plantengemeenschappen (Bossuyt & Honnay, 2008a). De diversiteit aan deze kenmerken zal immers zeer sterk de ecosysteemprocessen zoals dynamieken van energieverdeling en biomassa productie bepalen (Diaz & Cabido, 1997).

1.6 Plantenkenmerken en de zaadbank

Plantenkenmerken (E: *plant traits*) worden gedefinieerd als morfologische, fysiologische of fenologische kenmerken dewelke de fitness van de plant indirect beïnvloeden door effecten op de groei, reproductie en overleving (Violle *et al.*, 2007). Voorbeelden zijn het aantal zaden dat een plant produceert, vectoren van zaadverbreiding, de hoogte van de plant en de mate van houtigheid (Kleyer *et al.*, 2008). In een gemeenschap met een hoge plantendiversiteit, zoals kalkgraslanden, kunnen logischerwijze meer plantenkenmerken voorkomen. Dit biedt meer mogelijkheden voor een efficiënter gebruik van de grondstoffen (Chapin *et al.*, 1997). Uit plantenkenmerken kan het ecosysteem functioneren van een gemeenschap beter voorspeld worden dan uit de soortensamenstelling, aangezien deze ecosysteemfuncties rechtstreeks beïnvloed worden door de functionele kenmerken van de aanwezige soorten (Lavorel & Garnier, 2002). Dit heeft geleid tot een grote belangstelling voor uiteenlopende effecten op de functionele kenmerksamenstelling van plantengemeenschappen.

Bepaalde plantenkenmerken staan in relatie tot de langlevendheid van de zaden en daarmee gepaard met de zaadbank zelf. Zo blijkt uit onderzoek van Bekker *et al.* (1998) en Thompson *et al.* (1993) dat kleinere en lichtere zaden een langere levensduur hebben. Kleine zaden ontsnappen volgens de auteurs aan de processen die het doordringen in de bodem voorkomen, zoals kieming of predatie, waardoor ze langer leven. Zaden die in de zaadbank worden aangetroffen zullen dus over het algemeen kleine afmetingen hebben. Bekker *et al.* (2003) vond een significant verband tussen het aantal zaden van een soort in de bodem en de levensduur van het zaad. De auteurs verklaren dit door het feit dat soorten die vele zaden per individu produceren een veel hogere kans hebben dat een aandeel van deze zaden in de zaadbank terecht komt. Een andere verklaring komt van Jakobsson en Eriksson (2000). Zij vonden een *trade-off* tussen de zaadgrootte en het zaden aantal van een plant. Er kan dus gesteld worden dat de zaden van planten met een hoge fecunditeit (ruderalen) over het algemeen kleiner zullen zijn, met een hogere levensduur. Aan de hand van bepaalde plantenkenmerken kan dus veelal afgeleid worden of een plant al dan niet in de zaadbank aanwezig zal zijn.

1.7 Zaadbank in de Viroinvallei.

Ook in de Viroinvallei werd al zaadbankonderzoek uitgevoerd. Bossuyt *et al.* (2006) vergeleek hier de zaaddensiteit in de zaadbank van kalkgraslanden en gebieden bedekt door struiken en bos die op voormalig kalkgrasland gelegen waren. De soorten die de hoogste zaadbankdensiteiten hadden in de graslanden waren eerder algemeen voorkomende soorten die typisch waren voor nutriëntarme graslanden, zoals Sint-Janskruid (*Hypericum perforatum*) en Gewone zandmuur (*Arenaria serpyllifolia*). Deze planten waren echter niet abundant aanwezig in de vegetatie (Bossuyt *et al.*, 2006). De verklaring hiervoor is dat soorten van nutriëntarme graslanden over het algemeen zaden met een langere levensduur produceren (zie 1.5).

Typische kalkgraslandsoorten hadden echter een lage densiteit in de zaadbank, maar een zeer hoog aandeel in de vegetatie (86 % van de totale bedekking). Zaden van 71 soorten die aanwezig waren in de vegetatie werden niet teruggevonden in de bodem. De auteurs besluiten dan ook dat de afwezigheid van deze zaden een reflectie is van de kort levende, transiënte aard van de zaadbank van deze soorten (Bossuyt *et al.*, 2006). Wel dient hierbij opgemerkt te worden dat de auteurs een lage samplingdensiteit gebruikten. Per site werden namelijk maar tien kwadranten (1m²) bemonsterd, waarin tien boringen uitgevoerd werden. Mogelijk werden ook bepaalde zaadclusters niet ontdekt door het gebruik van te weinig plots (zie 1.5).

De densiteit en soortenrijkdom van de zaden van planten die op kalkgraslanden van de Viroin voorkomen blijkt sterk af te nemen met de tijd na verwaarlozing van een perceel (Bossuyt *et al.*, 2006). Dit wijten de auteurs aan het ontbreken van een input van nieuwe zaden en het bederf van de zaden. Men concludeert dan ook dat het herstel van soortenrijke kalkgraslanden na het weghalen van bossen en struiken niet enkel kan gebaseerd zijn op kieming vanuit de zaadbank. Ook Jacquemyn *et al.* (2011) vond dat het aantal zaden van kalkgrasplanten en het aantal kalkgraslandplanten zelf afnam na het verlaten van een kalkgrasland in Limburg.

1.8 Doelstellingen thesis

Plantenkenmerken-analyse

In de plantenkenmerken-analyse willen we nagaan welke plantenkenmerken de langlevendheid van de zaden bepalen. Zo kunnen we afleiden welke *traits* in relatie staan met het al dan niet vormen van een zaadbank. Ook willen we nagaan of deze plantenkenmerken gekoppeld kunnen worden aan de levensvormen van Raunkiaer of aan de CSR-groepen van Grime. Vervolgens kunnen we deze theoretische verwachtingen ook toetsen aan onze eigen resultaten.

Zaadbankstudie

Betreffende de zaadbankstudie willen we allereerst de soortenrijkdom en -samenstelling vergelijken tussen oude en gerestaureerde graslanden. Vervolgens willen we nagaan of dit bepaald wordt door de specialisatiegraad of de levensvorm van de soorten. Als tweede willen we nagaan of de zaaddensiteit beïnvloed wordt door de leeftijd. Hiervoor vergelijken we de zaadbank over een leeftijdsgradiënt van gerestaureerde kalkgraslanden. In een derde deel willen we kijken of de zaadbanksamenstelling van de graslanden onderling verschilt, en of deze differentiatie afhankelijk is van de leeftijd. Als vierde punt willen we nagaan wat het effect van ruimtelijke isolatie is op de zaadbanksamenstelling. Als laatste willen we nagaan wat de relatie is tussen de zaadbanksamenstelling en de vegetatie. Uit deze studie zullen we proberen suggesties voor het beheer en het beleid af te leiden.

2. Materiaal en methoden

2.1 Studiegebied

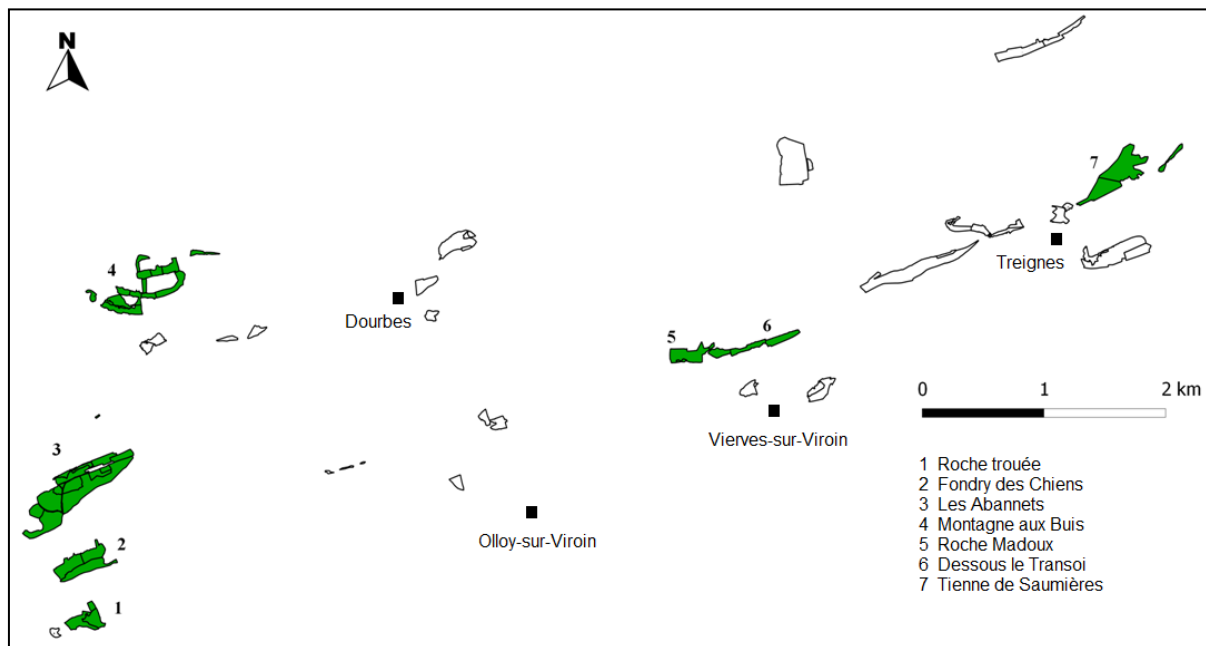
De kalkgraslanden van de Viroin behoren tot de meest soortenrijke en meest uitgebreide kalkgraslanden van België (Honday *et al.*, 2004). De Viroinstreek is gelegen in Zuid-West België in de provincie Namen, 75 km ten zuiden van Brussel (Fig. 1). Deze kalkgraslanden zijn onderdeel van de zogenaamde Calestienne. Dit is een ongeveer vier kilometer brede strook van kalksteenrotsen die zich uitstrekt van Wallers-Trélon in Frankrijk tot in de buurt van Luik (Honday *et al.*, 2004). Het kalkgesteente uit deze regio dateert uit het Devoon en het Carboon. In de Viroin is er een afwisseling waarneembaar van zachte zure schist stenen in de valleien met harde kalksteenrotsen op de top van de heuvels (Goossens, 1984). De kalkgraslanden in de regio beperken zich tot deze kalksteenrotsen die lokaal *tiennes* worden genoemd (Adriaens *et al.*, 2006). Momenteel is er ongeveer 200 ha. kalkgrasland terug te vinden in de Viroin (Adriaens, 2008; Delvingt, 2006). Er is een netwerk van graslandfragmenten van een verschillende leeftijd terug te vinden, en vaak bestaat een kalkgrasland fragment uit een mozaïek van subfragmenten van een verscheidene ouderdom. De restauratie van deze graslanden werd in twee delen uitgevoerd. In 1995 werd een klein aandeel gerestaureerd door het kappen van buxustruweel en dennenplantages, en van 2001 tot 2007 werden grotere gebieden gerestaureerd (Helsen *et al.*, 2013). Ook zijn er 'oude' subfragmenten terug te vinden. Deze zijn al aanwezig in de Viroin sinds de opstelling van De Ferrariskaart, en kennen een doorlopend beheer. Ongeveer 120 ha. kalkgrasland is 'nieuw' en ongeveer 73 ha. is 'oud' kalkgrasland (Adriaens, 2008; Delvingt, 2006).

2.2 Staalname

In september van 2012 werden grondstalen genomen op meerdere kalkgraslanden in de Viroin (Fig. 5). In totaal werden zeven kalkgraslanden onderzocht (Tabel 2).

Tabel 2: Overzicht van de onderzochte kalkgraslanden met het aantal subfragmenten en het aantal genomen plots, waarbij "aantal plots N" staat voor het aantal plots op nieuwe fragmenten, en "aantal plots O" staat voor het aantal plots op oude fragmenten.

Kalkgrasland	Aantal subfragmenten	Aantal plots N	Aantal plots O
Les Abannets (AB)	8	26	7
Dessous le Transoi (DLT)	3	2	5
Fondry des Chiens (FDC)	2	7	7
Montagne aux Buis (MB)	12	14	8
Roche Madoux (RM)	4	4	3
Roche trouée (RT)	3	3	3
Tienne de Saumières (TS)	4	14	3
Totaal	36	70	36



Figuur 5: Overzicht van de kalkgraslanden waarop de staalnamen werden genomen. Vierkantjes stellen de dorpen voor en vlakken de graslanden. Enkel de groengekleurde graslanden werden onderzocht. Voor een gedetailleerd overzicht van de ligging van de genomen plots op de aparte graslanden: zie appendix 1. Bron: QGIS 1.8.0.

Zowel op oude subfragmenten van de kalkgraslanden als op nieuwe (gerestaureerde) subfragmenten werden stalen genomen. De staalname gebeurde met een dichtheid van twee plots (staalnamepunten) per hectare grasland. Op de gerestaureerde subfragmenten werden reeds vegetatieopnamen gemaakt (Helsen *et al.*, 2012; Helsen *et al.*, 2013). De bodemplots in deze subfragmenten werden op dezelfde locatie als de vegetatieopnamen bemonsterd, om gegevens uit dit experiment met gegevens uit het vegetatie-experiment te kunnen vergelijken. De gegevens van deze eerdere opnamen zullen dus ook gebruikt worden in deze thesis. Plots op oude subfragmenten werden random uitgekozen. In totaal werden 106 plots afgebakend.

Voor iedere plot werd een kwadrant van 2m x 2m afgebakend. Hieruit werd een grondmengstaal bekomen van telkens 40 random grondboringen uitgevoerd met een gutsboor met een diameter van 2cm. Boring gebeurde tot op de minerale bodem, met verschillende dieptes tussen de graslanden (maximale diepte 25cm). Aanvullend werden twaalf 'diepteplots' uitgekozen. Deze dienden om na te gaan of bepaalde zaden zich op welbepaalde diepten bevonden. Hiervoor werden specifiek grondstalen van drie verschillende dieptes uitgeboord (0-5cm, 5-10cm en 10-15cm).

2.3 Voorbereiding van het kiemingsexperiment

De toegepaste zaadkiemingsmethode was gebaseerd op de handleidingen van Ter Heerdt *et al.* (1996) en Van Beek *et al.* (2004). De grondmengstalen werden eerst gewogen. Vervolgens werden deze gezeefd door een dubbele zeef. Mazen van 4mm dienden om de grove fractie (wortels, stenen,...) tegen te houden, terwijl het fijnere deel samen met de zaden door kon gaan als filtraat. De mazen van 0,2mm hadden als functie de leem- en kleifractie door te laten, terwijl het andere gedeelte waaronder zich mogelijks zaden bevonden achterbleef als residu. Om het zevingsproces te vergemakkelijken werd water gebruikt.

De plastic kiemingsbakken (40cm x 45cm) (met onderaan vier openingen om waterinstroom toe te laten) werden onderaan gevuld met een laag lavakorrels van ongeveer 1cm dik, om de drainage te vergemakkelijken. Boven deze lavakorrels werd gesteriliseerde potgrond aangebracht. De bakken werden zo vol mogelijk gevuld met deze grond, zodat een dikkere bodem aanwezig was. Vervolgens werd het gezeefde residu in een zo dun mogelijk laagje egaal uitgespreid op kiemingsbakken. Zo konden de zaden maximaal aan het licht blootgesteld worden. Boven dit residu werd ten slotte nog een dunne laag rijnzand uitgespreid om mosvorming te voorkomen. Er werden ook zes controlebakken klaargemaakt, zonder het residu. Zo kon worden nagegaan of de potgrond effectief steriel was en of als er mogelijke contaminatie vanuit de omgeving plaatsvond via inwaaierende zaden.

De 124 bakken (106 stalen, 12 dieptestalen en zes controlebakken) werden vervolgens at random in een serre geplaatst waar ze onderworpen werden aan een automatisch gecontroleerd dag-nacht regime van 16u licht en 8u donker. TL lampen zorgden zowel voor warmte als voor het licht. Via een pompmechanisme kon water eenmaal per week via de onderkant van de bakken binnendringen. Gele kleefbordjes werden geplaatst om insecten weg te vangen. Indien sporen van bladluizen zichtbaar waren werd gespoten met een insecticide. De ruimte werd ook goed verlucht via een ventilator om schimmelvorming te voorkomen. De temperatuur werd niet gecontroleerd.

2.4 Het zaadbankexperiment

Alle kiemplanten werden per bak gedetermineerd, mede met behulp van de Flora van België (Lambinon *et al.*, 1998), de veldgids van de Nederlandse flora (Eggelte, 2007) en de Britse vegetatieve Flora (Poland & Clement, 2009). Zodra bekend was welke planten er aanwezig waren, werden deze geteld en verwijderd. Dit verminderde de competitiedruk. Planten die nog niet determineerbaar waren, maar toch al voor competitie zorgden, werden overgeplant in aparte potten met stekgrond. Deze werden manueel bevochtigd en opgekweekt totdat ze determineerbaar waren. De aparte potjes werden bijgemest met Central Park[®] vloeibare

kunstmest. Wanneer geen kiemplanten meer uitkwamen (na 14 weken), werden de bakken aan een koudebehandeling onderworpen om mogelijke dormantie van de zaden te verbreken. Hiervoor werden alle 124 stalen in een koelkast geplaatst met een temperatuur van 2°C gedurende acht weken. Vervolgens werden deze weer random in de serre geplaatst en bijgemest met Central Park[®] vloeibare kunstmest. Opnieuw werd dezelfde determinatieprocedure toegepast.

2.5 Data-analyse

Alle analyses werden uitgevoerd in Statistica 10 (Statsoft inc., 1995). Indien bekeken variabelen niet normaal verdeeld waren werd telkens eerst een transformatie uitgetoetst alvorens op niet-parametrische testen over te schakelen.

2.5.1. Plantenkenmerken-analyse

Voor 408 planten die op een gegeven moment werden aangetroffen op de kalkgraslanden van de Viroinvlei (Butaye *et al.*, 2005; Helsen *et al.*, *pers. comm.*) werden verscheidene plantenkenmerken opgezocht (Tabel 3). De LEDA database (Kleyer *et al.*, 2008) leverde data op voor tien kenmerken (hoogte van de plant, de zaadlevendheidsindex, het aantal zaden per plant, de zaaddispersiecapaciteit (autochoor, hemerochoor, anemochoor, endozoöchoor, epizoöchoor), de leeftijd bij eerste bloei en de bladoppervlakte). Data omtrent de zaadlevendheidsindex werden berekend zoals beschreven in ondertitel 1.4. Uit de Biolflor database (Klotz *et al.*, 2002) werd voor elf plantenkenmerken data bekomen (levensduur, rozet type, zaadvorm, zaadbreedte, zaadlengte, zaadgewicht, fertilisatiesysteem, diaspore type, reproductie type, pollenvector, maand waarin de bloei aanvangt en levensvorm). Data omtrent de kenmerken stikstoffixatie en specialisatie werden bekomen uit de Flora van België (Lambinon *et al.*, 1998) en de plantenatlas van Vlaanderen (Van Landuyt *et al.*, 2006). Verder maakten we gebruik van de Ellenbergwaarden (Ellenberg *et al.*, 1992). Voor een overzicht van de gebruikte plantenkenmerken en hun uitleg, zie tabel 3. Voor alle gevonden plantenkenmerken werd nagegaan of deze in verband stonden met de zaadlevendheid. Zo krijgen we een idee van welke plantenkenmerken bepalen of een soort al dan niet een zaadbank zal vormen. Aanvullend werden sommige plantenkenmerken ook onderling vergeleken om verbanden te verklaren.

Tabel 3: Overzicht van de opgezochte plantenkenmerken met hun beschrijving

Plantenkenmerk	Beschrijving	% van de soorten met beschikbare data
Specialisatie	Geeft aan of een soort generalist (g) of specialist (s) van kalkgraslanden in België is	100
Ellenberg L	Ellenberg lichtgetal: gaande van 1 (schaduwplanten) tot 9 (planten van de volle zon)	98,3
Ellenberg R	Ellenberg reactiegetal: gaande van 1 (planten van sterk zure bodems) tot 9 (planten van sterk basische bodems)	97,5
Ellenberg T	Ellenberg temperatuursgetal: gaande van 1 (planten van koude regio's) tot 9 (planten van warme regio's)	97,5
Ellenberg K	Ellenberg kontinentaliteitsgetal: gaande van 1 (Zuid- en West-Europese soorten) tot 9 (Oost-Europese soorten)	97,5
Ellenberg F	Ellenberg vochtgetal: gaande van 1 (extreme droogte indicator) tot 12 (onderwaterplant)	97,5
Ellenberg N	Ellenberg stikstofgetal: gaande van 1 (planten van stikstofarme bodems) tot 9 (planten van de stikstofrijke bodems)	98
Start bloei	Maand waarin de bloei begint aanvangt (1: januari, 2: februari, enz.)	99,5
Pollenvector	1. insecten 2. zelfbestuiving 3. wind 4. water 5. zelfbestuiving en insecten 6. wind en insecten 7. wind en zelfbestuiving	94,9
Reproductie type	1. voornamelijk zaden/sporen 2. zaden/sporen en vegetatief 3. voornamelijk vegetatief	99,5
Diaspore type	1. vrucht 2. zaad 3. spore 4. vegetatief	99,5
Zaadlengte	Gemiddelde lengte van een zaad (mm)	88,5
Zaadbreedte	Gemiddelde breedte van een zaad (mm)	81,9
Zaadvorm	zaad lengte / zaad breedte	84,6
Zaadgewicht	Gemiddeld gewicht van een zaad (mg)	86
Fertilisatiesysteem	1. autogaam 2. <i>mixed mating</i> systeem 3. allogaam	86,5
Rosette type	1. bladeren in een rozet 2. half-rozet plant 3. bladeren verspreid over de stengel	99,8
Levensduur	1. eenjarig 2. tweejarig 3. kortlevend meerjaring (< 5 jaar) 4. langlevend meerjaring (> 5 jaar)	99,8
Levensvorm	1. therofyt 2. geofyt 3. chamaeofyt 4. hemicryptofyt 5. fanerofyt	99,3
Zaad-langlevendheid	<i>Seed Longevity Index</i> : voor berekening zie 1.4	79,4
Hoogte	Hoogte van de plant (cm)	98
Log aantal zaden	Logaritmisches getransformeerd aantal zaden per plant	86
Autochoor	0. geen autochorie 1. zelfdispersie	93,9
Hemerochoor	0. geen hemerochorie 1. zaaddispersie door de mens	93,9
Anemochoor	0. geen anemochorie 1. zaaddispersie door de wind	93,9
Endozoöchoor	0. geen endozoöchorie 1. zaaddispersie na vertering	93,9
Epizoöchoor	0. geen epizoöchorie 1. adhesieve zaaddispersie via dieren	93,9
Leeftijd bij eerste bloei	De leeftijd wanneer de eerste bloeiperiode optreedt (1. < 1 jaar 2. tussen 1 en 5 jaar 3. > 5 jaar)	73,3
Bladoppervlakte	Gemiddelde oppervlakte van het blad (mm ²)	86
N-fixatie	0. geen stikstof fixatie 1. wel stikstof fixatie	100

Continue plantenkenmerken werden geanalyseerd met de Pearson correlatie test. Als er niet kon voldaan worden aan de normaliteit assumptie, werd de niet-parametrische Spearman rang test toegepast. De continue variabelen die significant in relatie stonden met de zaad-langlevendheid werden vervolgens tezamen met een *Principal Component Analysis* (PCA) verder geanalyseerd. Hierna werd een biplot opgesteld waarin zowel deze variabelen weergegeven zijn, als de levensvormen volgens Raunkiaer voor de soortenordinatie. Zo kan

de relatie nagegaan worden tussen deze variabelen onderling enerzijds en tussen de variabelen en de levensvormen anderzijds (Tabel 3).

Categorische variabelen werden ofwel met een t-test (2 categorieën) ofwel met een ANOVA test (meer dan twee categorieën) geanalyseerd. Bij de t-test werd gecontroleerd of beide groepen normaal verdeeld waren en of de varianties homogeen waren. Dit was echter nooit het geval, zelfs niet na transformatie van de afhankelijke variabele, en daarom werd de niet-parametrische Mann-Whitney U (MWU) test toegepast. Ook bij de ANOVA testen werd zowel de assumptie van normaliteit als van homogene varianties nagegaan. Dit laatste gebeurde met de Levene's test op het 0,05 significantieniveau. Indien een significant verschil werd bekomen met een ANOVA, werd een Tukey test uitgevoerd om te zien tussen welke variabelen het significante verschil aanwezig was. Indien niet voldaan aan de assumpties, en ook niet na transformatie van de afhankelijke variabele, werd de niet-parametrische Kruskal-Wallis ANOVA test uitgevoerd.

2.5.2 Zaadbankexperiment

A. Verloop

Voor de 12 diepteplots (drie boringen op verschillende dieptes op vier locaties) werden de soortenrijkdom en de zaaddensiteit vergeleken tussen de drie bodemdiepten (0-5cm, 5-10 cm en 10-15cm) met een Friedman ANOVA. Dit is de niet-parametrische equivalent van de repeated measures ANOVA. Er waren immers telkens drie (afhankelijke) dieptemetingen per locatie. De soortenrijkdom werd bepaald als het aantal plantensoorten die per plot voorkwamen in de zaadbank. De zaaddensiteit werd berekend door het totaal aantal gevonden zaden per plot om te rekenen naar aantal zaden per m². Vervolgens werd gekeken of de soortenrijkdom en de zaaddensiteit van een plot gecorreleerd waren met het gewicht van de grondstalen met behulp van een lineaire regressie. Deze analyse werd uitgevoerd voor alle stalen van de verschillende graslanden (n=106).

B. Zaadbankdiversiteit

Zowel de soortenrijkdom als de zaaddensiteit werden vergeleken tussen oude en nieuwe graslanden met behulp van t-testen. Ook de Shannon Wiener diversiteit, de Simpson diversiteit en de 'Evenness' werden berekend voor alle plots met behulp van het programma Past (Hammer et al., 2001). De Shannon-Wiener index berekent men als volgt:

$$H = -\sum_{i=1}^S ((n_i/n)\ln(n_i/n))$$

Hierbij staat S voor het aantal soorten, n staat voor het totaal aantal individuen en n_i voor het aantal individuen van soort i. De Simpson index wordt berekend als:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S \left((n_i/n)^2 \right)$$

De 'Evenness' is een maat van relatieve abundantie van de verscheidene soorten in de gemeenschap en wordt berekend door de Shannon-Wiener index te delen door het logaritme van het aantal soorten (Hammer *et al.*, 2001). Alle diversiteitsmaten werden vergeleken tussen oude en nieuwe kalkgraslanden met behulp van t-testen.

Met behulp van ANOVA werden de soortenrijkdom en de zaaddensiteit vergeleken tussen de verschillende nieuwe kalkgraslanden, om verschillen tussen de individuele graslanden te testen. Een meerwegs tussengroeps ANOVA met interactie-effect tussen de leeftijd van de kalkgraslanden (oud/nieuw) en de verschillende graslanden zelf werd uitgevoerd als mogelijke bijkomende verklaring. Ook werd een indicator analyse uitgevoerd in PC-ORD 6.0 (MjM Software) aan de hand van de methode van Dufrêne en Legendre om na te gaan welke soorten voornamelijk voorkomen in zaadbanken van oude kalkgraslanden en welke voornamelijk voorkomen in zaadbanken van nieuwe kalkgraslanden. Deze indicatorwaarden variëren van 0 (geen indicatie) tot 100 (perfecte indicatie). De statistische significantie van de bekomen waarden worden vervolgens nagegaan met behulp van Monte-Carlo randomnstatietests, waarbij 9999 permutaties werden uitgevoerd.

C. Zaadbank-soortensamenstelling

Er werd een *Detrended Correspondence Analyse* (DCA) uitgevoerd op de samenstelling van de zaadbank stalen met behulp van het programma PC-ORD 6.0. Hierbij worden de dimensies (de DCA assen) berekend die overeenstemmen met de grootste variatie in soortensamenstelling. Op deze manier kunnen meerdere soorten gelijktijdig bestudeerd worden (Van Katwijk & Ter Braak, 2008). Het resultaat is een rangschikking, waarbij plots met een gelijkaardige soortensamenstelling dicht bij elkaar gelegen zijn, en plots met sterk verschillende soortensamenstelling verder uit elkaar gelegen zijn (Gauch, 1982; fide Van Katwijk & Ter Braak, 2008). De DCA plotscores van oude kalkgraslanden werden vergeleken met deze van nieuwe kalkgraslanden met behulp van een t-test. Zo kan nagegaan worden of er een significant verschil is in soortensamenstelling tussen oude en nieuwe kalkgraslanden. Ook voor de vegetatieopnamen uit eerder onderzoek (zie 2.2) werd een DCA uitgevoerd. Deze werd uitgevoerd op een gereduceerde datafile met enkel soorten die in meer dan 5% van de opnamen voorkomen.

Ook werd gekeken naar het verschil in het aantal generalisten t.o.v. het aantal specialisten op oude en nieuwe kalkgraslanden aan de hand van Wilcoxon t-testen (aantal soorten/zaaddensiteit). Bijkomend werd nagegaan met MWU testen of generalisten en specialisten afzonderlijk een verschillend voorkomen hadden op nieuwe en oude

kalkgraslanden (wederom aantal soorten/zaaddensiteit). Vervolgens werden analyses uitgevoerd betreffende de leeftijd van de nieuwe kalkgraslanden. Er werd gekeken of de soortenrijkdom en de zaaddensiteit steeg met de leeftijd van de recente plots (graslandfragmenten) sinds restauratie aan de hand van respectievelijk een lineaire regressie analyse en een Spearman rang correlatie. Met behulp van Spearman rang correlaties werd bovendien nagegaan of dit leeftijdseffect verschilt tussen de Raunkiaer levensvormen en generalisten/specialisten.

De verdeling van het aantal zaden en de soortenrijkdom van de gekiemde zaden over de verschillende levensvormen van Raunkiaer werd vergeleken met een Friedman ANOVA. Hierna werden zowel de soortenrijkdom als de zaaddensiteit betreffende deze levensvormen vergeleken tussen de oude en nieuwe kalkgraslanden met MWU testen. Ten slotte werd met een Chi-kwadraat test gekeken of specialisten aangetroffen in de zaadbank verschilden in de verhouding van de vertegenwoordiging van levensvormen van Raunkiaer tegenover de generalisten.

D. Zaadbank-differentiatie

Om na te gaan of de soortensamenstelling van oude kalkgrasland zaadbanken onderling meer gelijkend is (convergentie) dan deze van nieuwe graslanden werden vier differentiatiematen (Euclidische afstand, Bray-Curtis afstand, Raup-Crick β en F_{ST}) vergeleken tussen oude en nieuwe kalkgraslanden. De Euclidische afstand (D_E) wordt als volgt berekend:

$$D(x, y) = \sqrt{\left(\sum_{i=1}^S (x_i - y_i)^2\right)}$$

Hierbij staat x_i voor het aantal individuen van soort i in plot x . Dit is idem voor y_i . De formule voor de Bray-Curtis afstand (D_{BC}) is:

$$D(x, y) = 1 - 2\left(\frac{\sum_{i=1}^S \text{MIN}(x_i, y_i)}{\sum_{i=1}^S (x_i + y_i)}\right)$$

Hierbij staat MIN voor de kleinste van de twee aangegeven getallen (MjM Software). De D_E en D_{BC} werden berkenend met behulp van PC-ORD 6.0 (MjM Software). De Raup-Crick β diversiteit (β_{RC}) geeft informatie over de mate waarmee twee gemeenschappen (plots) meer verschillend (of meer gelijkend) zijn in soortensamenstelling dan verwacht op basis van toeval (Chase *et al.*, 2011). De β_{RC} werd in het programma Past berekend (Hammer *et al.*, 2001). De F_{ST} is oorspronkelijk ontwikkeld als een maat voor de genetische differentiatie tussen populaties. Hier beschrijft de F_{ST} de verschillen in de relatieve vertegenwoordiging van soorten tussen twee plots (Baeten *et al.*, 2010). Deze werd als volgt berekend in Excel: $F_{ST}(x,y) = (E_{tussen} - E_{binnen}) / E_{tussen}$. Hierbij staan E_{tussen} en E_{binnen} respectievelijk voor de 'Evenness' gebaseerd op de totale aantallen van elke soort in de twee bekeken plots en het gemiddelde van de 'Evenness' waarden voor elk van de twee plots (Baeten *et al.*, 2010). Voor al deze

afstandsmaten geldt dat hoe groter ze zijn, hoe kleiner de gelijkheid is tussen de eenheden. Voor de vier bekomen afstandsmatrices werd vervolgens de gemiddelde afstand voor elk plot ten opzichte van alle andere plots binnen een leeftijdsgroep (oud en nieuw) handmatig berekend. Deze gemiddelden werden vervolgens met behulp van een MWU test vergeleken tussen oude en nieuwe plots. Ook werd hetzelfde uitgevoerd betreffende de Euclidische geografische afstand (D_G), om na te gaan of de soortensamenstelling afhankelijk is van de afstand tussen de graslanden. Deze werd berekend met behulp van het programma QGIS 1.8.0 (QGIS Development Team, 2012).

Om te kijken of de geografische locatie een invloed had op de samenstelling van de zaadbank werden drie afstandsmatrices samengesteld op basis van de Euclidische geografische afstand tussen de plots (alle plots/enkel oude plots/enkel nieuwe plots). Vervolgens werden de correlaties tussen de geografische-afstandsmatrices en de zaadbankafstandsmatrices nagegaan met Manteltesten gebaseerd op Monte-Carlo randomisatie, waarbij 9999 permutaties werden uitgevoerd in PC-ORD 6.0. Dit werd uitgevoerd voor de vier eerder beschreven zaadbankafstandsmatrices. In totaal werden echter 11 Manteltesten uitgevoerd (in plaats van 12) om de invloed van de geografische locatie na te gaan (gegevens voor alle plots tezamen voor de F_{st} matrix waren niet beschikbaar). Aan de hand van deze analyses werd dus nagegaan of er sprake was van isolatie door afstand (E: *isolation by distance*). Dit beschrijft de tendens van populaties die geografisch dicht bij elkaar gelegen zijn om meer gelijkend te zijn dan populaties die verder van elkaar gelegen zijn (Wright, 1943).

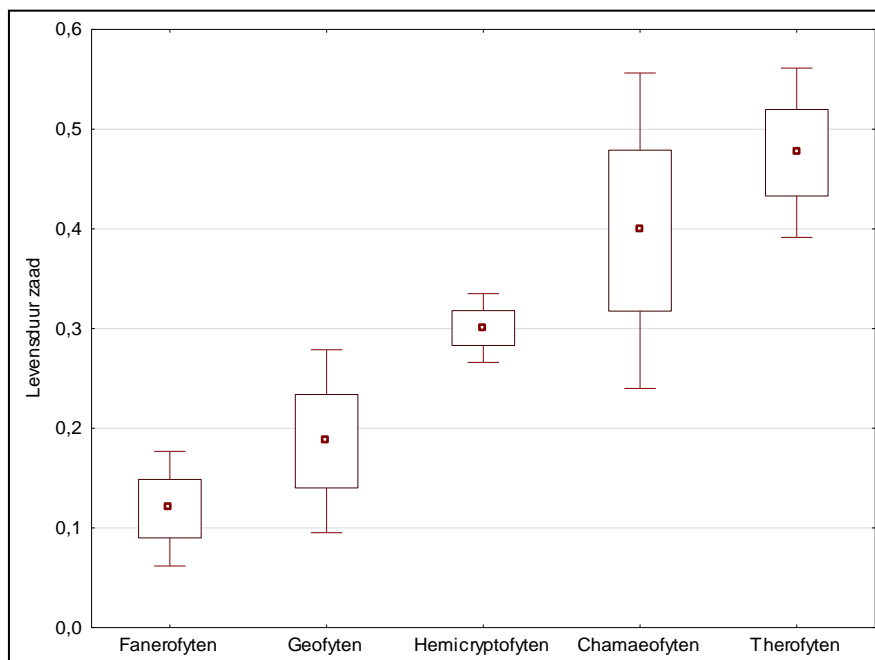
E. Gelijkenis vegetatie en zaadbank

Om te kijken in welke mate de soortensamenstelling van de vegetatie en de zaadbank op nieuwe kalkgraslanden overeenkwamen werden bovendien drie afstandsmatrices berekend voor de vegetatieopnamen op basis van de soortensamenstelling, namelijk D_E , D_{BC} en β_{RC} . Vervolgens werden de correlaties tussen de vegetatie-afstandsmatrices en de zaadbankafstandsmatrices voor de drie afstandsmaten nagegaan met behulp van Manteltesten in PC-ORD. Ten slotte werden de Manteltesten herhaald met de gereduceerde datafile van de vegetatieopnamen met enkel de soorten die in meer dan 5% van de opnamen voorkomen. Er wordt dus meer bepaald nagegaan of plots met een gelijkaardige vegetatiesamenstelling ook een gelijkende zaadbanksamenstelling hebben. Merk op dat enkel voor de nieuwe graslanden vegetatieopnamen voor handen waren. Voor deze analyses werden dus enkel de zaadbankgegevens van de nieuwe graslanden gebruikt.

3. Resultaten

3.1 Plantenkenmerken-analyse

De MWU test duidde twee variabelen aan die significant in verband staan met levensduur van het zaad. Soorten met zaden die via endozoöchorie worden verspreid hebben gemiddeld een hogere zaadleeftijd dan soorten wiens zaden niet endozoöchoor verspreid worden. Exact hetzelfde geldt voor zaden die via epizoöchorie worden verspreid (Tabel 4). De ANOVA analyse toonde een significant verschil aan tussen de verschillende fertilisatiesystemen (Tabel 4). De Tukey test toonde aan dat planten met een *mixed mating* systeem een significant hogere zaadlanglevendheid hebben dan allogame planten ($p=0,037$). De levensduur van zaden blijkt significant hoger bij half-rozet planten dan planten zonder rozet ($p=0,032$). Zowel één- ($p<0,0010$) als tweejarige planten ($p=0,033$) bleken zaden van een langere levensduur te produceren dan meerjarige planten. Ook blijkt de leeftijd van de eerste bloei een sterk effect te hebben op de langlevendheid van de zaden. Onze resultaten tonen aan dat hoe later een plant tot bloei komt, hoe korter de levensduur van deze zaden zal zijn (alle *pairwise* Tukey-testen significant met p -waarde $<0,010$). Ten slotte werd betreffende de levensvormen van Raunkiaer vastgesteld dat therofyten zaden produceren van een significant langere levensduur dan zowel geofyten ($t=4,6$; $p<0,0010$), hemicryptofyten ($t=3,4$; $p=0,0061$) als fanerofyten ($t=6,4$; $p<0,0010$) (Fig. 6). Fanerofyten bleken een significant lagere levensduur van de zaden te hebben dan zowel chamaeofyten ($t=3,6$; $p=0,0030$) als hemicryptofyten ($t=4,9$; $p<0,0010$) (Fig. 6).



Figuur 6: De gemiddelde levensduur van de zaden van planten behorende tot de aangegeven levensvormen van Raunkiaer. De rechthoeken stellen het gemiddelde \pm de standaardfout weer, de verticale foutenvlaggen geven het gemiddelde $\pm 1,96$ keer de standaardfout weer.

Tabel 4: Verband van plantenkenmerken met levensduur van het zaad. De gebruikte testen, bekomen teststatistieken en p-waarden voor elk van de variabelen zijn weergegeven. MWU: Mann-Whitney U test, KW ANOVA: Kruskal-Wallis ANOVA. *: Variabelen waarbij de afhankelijke variabele (levensduur van het zaad) log+1 getransformeerd werd om aan de assumpties te voldoen. Significante waarden zijn in het vetgedrukt en cursief weergegeven.

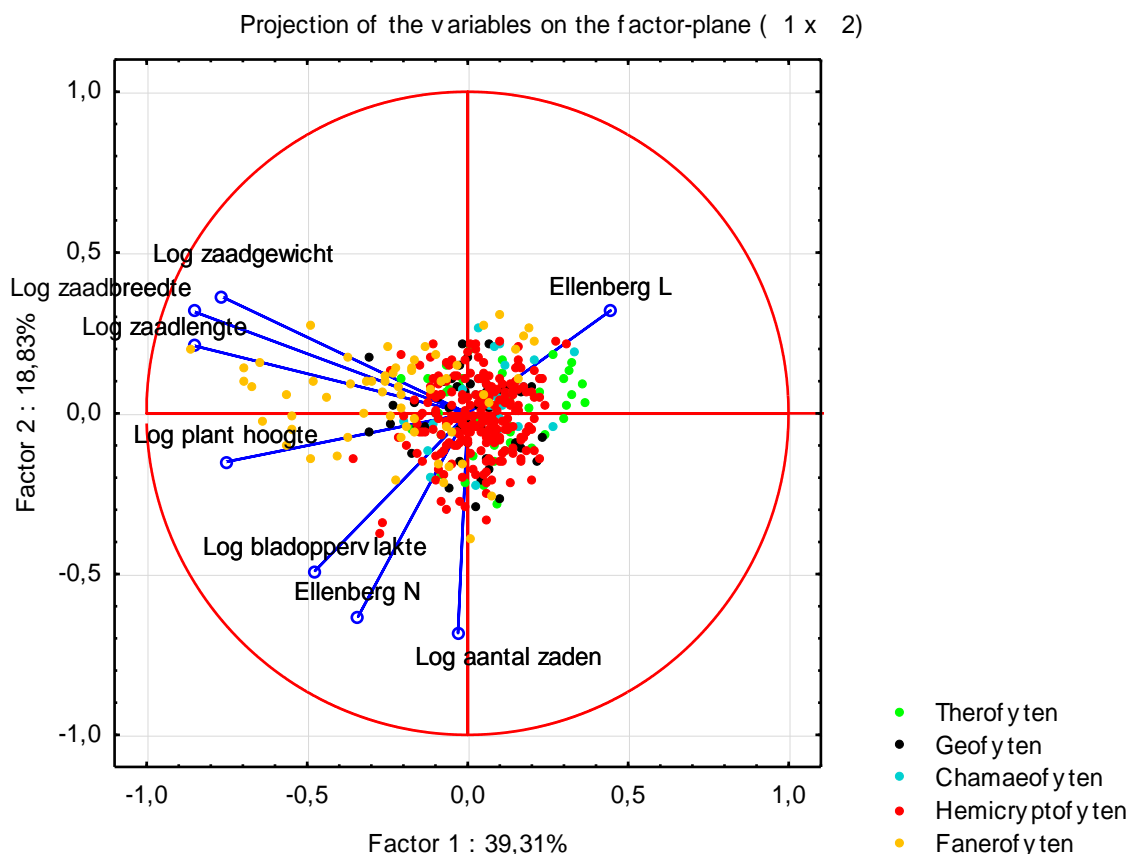
Variabele	Test	Test stat	P
Specialist/generalist	MWU	$z = 1,5$	0,14
N-fixatie	MWU	$z = 0,6$	0,56
Autochoor	MWU	$z = -1,6$	0,11
Hemerochoor	MWU	$z = -1,6$	0,10
Anemochoor	MWU	$z = -0,37$	0,71
Endozoöchoor	MWU	$z = -2,4$	0,016
Epizoöchoor	MWU	$z = -3,1$	0,0019
Diaspore type	MWU	$z = -0,9$	0,39
Reproductie type	KW ANOVA	$H = 3,03$	0,51
Fertilisatiesysteem*	ANOVA	$F = 3,9$	0,021
Rozet type	KW ANOVA	$H = 7,02$	0,030
Levensduur	KW ANOVA	$H = 35,4$	<0,0010
Leeftijd bij eerste bloei	KW ANOVA	$H = 33,8$	<0,0010
Levensvorm	KW ANOVA	$H = 50,8$	<0,0010

Voor de PCA analyses werden enkel de continue variabelen gebruikt die significant in verband bleken te staan met de levensduur van de zaden aan de hand van de Pearson test of de Spearman rang test (Appendix 2). Bij de PCA kan de eerste as (PC1), die 39,31% van de variatie verklaard, beschreven worden als de voornaamste gradiënt van zaad- en plantenafmeting met zaadgewicht, zaadbreedte, zaadlengte en planthoogte als verklarende variabelen. De tweede as (PC2), dewelke 18,83% van de variatie verklaard is voornamelijk geassocieerd met het Ellenberg stikstofgetal, de bladoppervlakte en het aantal zaden (Tabel 5).

Tabel 5: Factor coördinaten van de Principaal Component Analyse (PCA) betreffende de significante variabelen. Significantie werd bepaald met Spearman rang testen tussen de principaal component scores en de variabelen. Telkens werden de Spearman correlatie coëfficiënten weergegeven.

Variabele	PC1		PC2		PC3	
	R	P waarde	R	P waarde	R	P waarde
Ellenberg L	0,44	<0,0010	0,32	<0,0010	-0,64	<0,0010
Ellenberg N	-0,34	<0,0010	-0,63	<0,0010	0,36	<0,0010
Log zaadgewicht	-0,76	<0,0010	0,36	<0,0010	-0,11	0,25
Log zaadbreedte	-0,85	<0,0010	0,32	<0,0010	-0,04	0,55
Log zaadlengte	-0,85	<0,0010	0,21	<0,0010	-0,07	0,55
Log plant hoogte	-0,75	<0,0010	-0,15	<0,0010	-0,16	0,0060
Log bladoppervlakte	-0,48	<0,0010	-0,49	<0,0010	-0,20	0,0023
Log aantal zaden	-0,03	0,43	-0,68	<0,0010	-0,56	<0,0010
Levensduur van het zaad	0,37	<0,0010	-0,26	<0,0010	0,02	0,66
Eigenwaarde	3,15		1,50		0,94	
% variantie verklaard	39,31%		18,83%		11,74%	

In de biplot wordt een clustering van de fanerofyten waargenomen, apart van de andere levensvormen. Deze levensvorm blijkt geassocieerd te zijn met grotere zaadafmetingen, en met een grotere planthoogte. Therofyten blijken voornamelijk te clusteren in het positieve deel van principaal component één. Een associatie met het Ellenberg lichtgetal is zichtbaar. De overige levensvormen clusteren rond het middelpunt van het biplot (Fig. 7). Planten met zaden met een hoge langlevendheid zouden geclusterd moeten zijn in het positieve gedeelte van principaal component één en in het negatieve gedeelte van principaal component twee (Tabel 5). Uit de biplot volgt dat een toenemende zaadleeftijd wordt gekenmerkt door een afnemende zaadlengte, -breedte en -gewicht en een dalende hoogte van de plant. Hoe meer zaden een plant echter produceert, hoe langer de levensduur van het zaad is. Het Ellenberg stikstofgetal, het Ellenberg Lichtgetal en de bladoppervlakte blijken volgens de biplot niet in relatie te staan met de zaadlanglevendheid (Fig. 7). De correlatieanalyses spreken dit echter tegen. Langlevende zaden worden gekenmerkt door zowel een hogere lichtvoorkeur als een hogere nutriëntenvoorkeur. Bladoppervlakte neemt echter af met een toenemende zaadlanglevendheid (Appendix 2).



Figuur 7: Biplot met de DCA scores en de continue variabelen die significant in relatie staan met de levensduur van de zaden. De verschillende kleuren stellen de verscheidene levensvormen van Raunkiaer weer. DCA as 1 verklaart 39,31% van de variantie, DCA as 2 verklaart 18,83% van de variantie.

3.2 Het zaadbankexperiment

3.2.1 Verloop

In totaal kiemden 3345 zaden van 130 soorten in de periode voordat de bakken aan de koudebehandeling onderworpen werden. Na de koudebehandeling kiemden nog eens 956 zaden behorende tot 69 soorten, wat leidde tot een totaal van 4301 zaden van 134 soorten. De koudebehandeling zorgde dus voor de kieming van vier nieuwe soorten (Valse salie (*Teucrium scorodonia*), Grote leeuwenklauw (*Aphanes arvensis*), Gewone duivenkervel (*Fumaria officinalis*) en Zwaluwtong (*Fallopia convulvulus*)). Soorten die opvallend meer kiemden na de koudebehandeling waren Hopklaver (*Medicago lupulina*), Ruig viooltje (*Viola hirsuta*) en Zeegroene zegge (*Carex flacca*). In het totaal kiemden 67 plantensoorten in zowel bakken van oude als van nieuwe plots, 51 plantensoorten enkel in bakken van nieuwe plots en 11 plantensoorten enkel in bakken van oude plots. In de diepteplots kiemden vijf soorten die niet in de andere plots voorkwamen (Rood guichelheil (*Anagallis arvensis*), Korrelganzenvoet (*Chenopodium polyspermum*), Blaartrekkende boterbloem (*Ranunculus sceleratus*), Klein kruiskruid (*Senetio vulgaris*) en Vogelmuur (*Stellaria media*)). De gemiddelde zaaddensiteit was 2963 zaden/m².

De gegevens van het experiment tot zeven weken na de koudebehandeling werden in deze thesis opgenomen. Door tijdsgebrek konden dus niet alle kiemplanten verder gedetermineerd worden. Deze verdere gegevens zullen wel gebruikt worden voor het doctoraatsonderzoek van Kenny Helsen. Voor de koudebehandeling kiemden geen planten in de controlebakken, na de koudebehandeling kiemde echter één plant (*Juncus bufonius*) in een controlebak. In totaal stierven 10 planten tijdens het experiment voordat deze konden gedetermineerd worden. 13 planten kiemden die niet vermeld werden in de lijst met de 408 planten die op een gegeven moment werden aangetroffen in de Viroinvallei (gebruikt voor de plantenkenmerkanalyse). De vier meest abundante soorten in de zaadbank van de nieuwe kalkgraslanden waren Sint-Janskruid, Gewone zandmuur, Veldbeemdgras en Canadese fijnstraal. In de zaadbank van oude kalkgraslanden bleken dit Sint-Janskruid, Voorjaarsganzerik, Wilde marjolein en Geel zonneroosje te zijn (Tabel 6) .

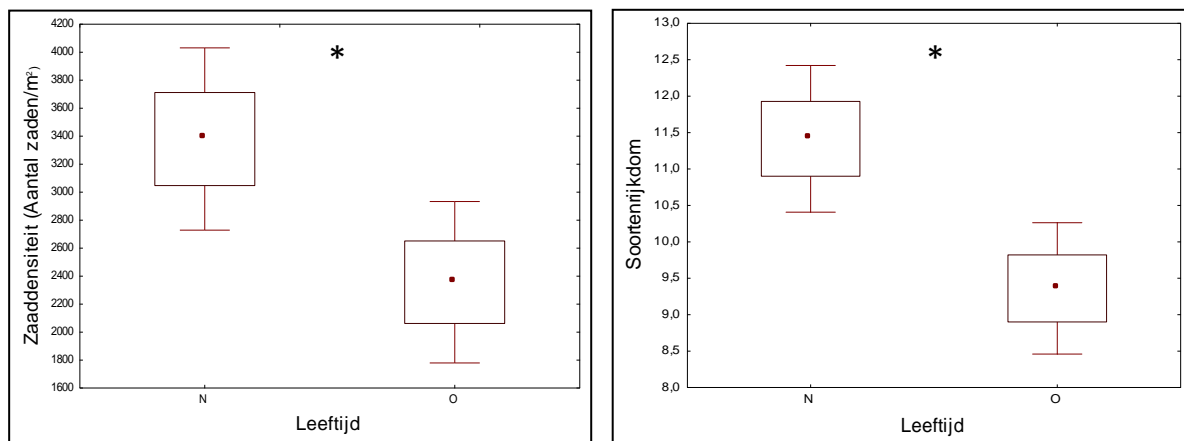
Tabel 6: De vier meest abundante soorten aangetroffen in de zaadbank van nieuwe en oude kalkgraslanden. Tussen haakjes staat het procent zaden van de soort ten opzichte van het totaal aantal teruggevonden zaden in de desbetreffende graslanden (nieuw of oud).

Nieuw	Oud
<i>Hypericum perforatum</i> (16%)	<i>Hypericum perforatum</i> (25%)
<i>Arenaria serpyllifolia</i> (8%)	<i>Potentilla neumanniana</i> (8%)
<i>Poa pratensis</i> (6%)	<i>Origanum vulgare</i> (7%)
<i>Conyza canadensis</i> (5%)	<i>Helianthemum nummularium</i> (6%)

De Friedman ANOVA analyse leverde geen significante verschillen op in soortenrijkdom ($\chi^2=4,3$; $p=0,12$) en zaaddensiteit ($\chi^2=3,6$; $p=0,17$) tussen de verscheidene diepten. Wel dient opgemerkt te worden dat voor deze diepteplots maar een beperkt aantal stalen genomen werd. Ook het gewicht van de bodemstalen die per plot bekomen waren bleek niet significant in verband te staan met de soortenrijkdom ($t=1,0$; $p=0,34$) en het logaritme van de zaaddensiteit ($t=-0,2$; $p=0,83$) van deze plots.

3.2.2 Zaadbankdiversiteit

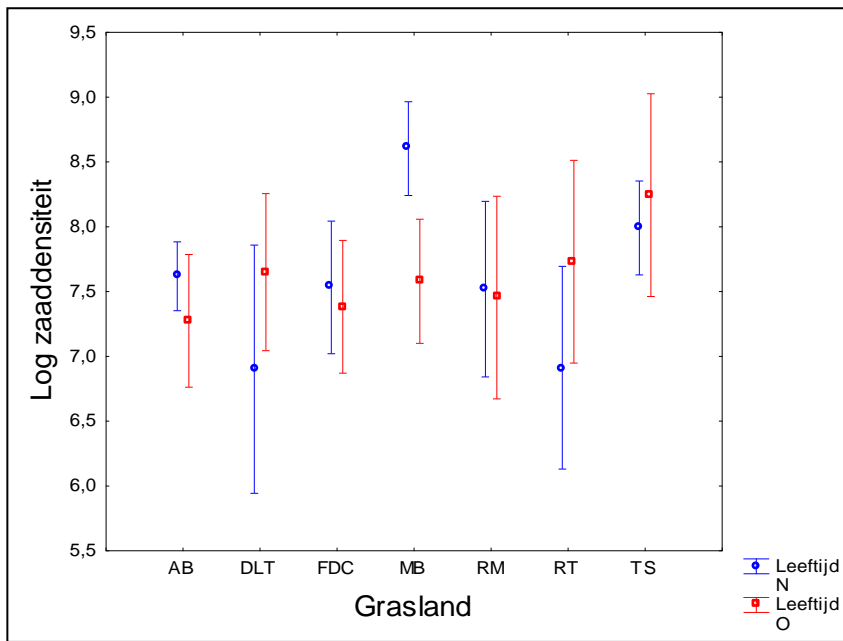
De soortenrijkdom ($t=3,0$; $p=0,0036$) en de zaaddensiteit ($t=2,3$; $p=0,023$) bleken op de nieuwe kalkgraslanden significant hoger te zijn dan op de oude kalkgraslanden (Fig. 8). De Simpson diversiteit ($t=0,3$; $p=0,74$) en de 'Evenness' ($t=-1,3$; $p=0,21$) verschilden niet tussen oude en nieuwe kalkgraslanden. De Shannon-Wiener diversiteit vertoonde echter een significant hogere waarde voor nieuwe graslanden ($t=2,2$; $p=0,032$).



Figuur 8: Gemiddelde zaaddensiteit t.o.v. de leeftijd van de kalkgraslanden (links) en de gemiddelde soortenrijkdom t.o.v. de leeftijd van de kalkgraslanden. De rechthoeken stellen het gemiddelde \pm de standaardfout weer, de verticale foutenvlaggen geven het gemiddelde \pm 1,96 keer de standaardfout weer. Een sterretje duidt op een significant verschil.

De ANOVA leverde geen significant verschil op in soortenrijkdom tussen de verschillende bestudeerde kalkgraslanden ($F=2,1$; $p=0,061$). Wel werd een significant verschil waargenomen in het logaritme van de zaaddensiteit tussen de kalkgraslanden ($F=3,7$; $p=0,0025$). De Tukey *Post Hoc* analyse toonde een significant verschil aan tussen Montage aux Buis (MB) en Les Abannets (AB) ($p=0,013$) enerzijds en MB en Fondry des Chiens (FDC) anderzijds ($p=0,033$). De meerwegs tussengroeps ANOVA toonde aan dat het significant verschil tussen MB en AB veroorzaakt wordt door de nieuwe plots (maar niet de oude plots) van MB, die significant verschillen van zowel de nieuwe ($p=0,0027$) als de oude plots ($p=0,0045$) van AB (Fig. 9). Ook het significant verschil tussen MB en FDC blijkt te wijten te zijn aan de nieuwe plots van MB, die significant verschillen van de oude plots van FDC ($p=0,014$) (Fig. 9).

Ten slotte bleek ook dat nieuwe plots van MB significant verschillen van nieuwe plots van Roche trouée (RT) ($p=0,013$). MB blijkt ook duidelijk meer zaden te hebben op de nieuwe plots dan op de oude (Fig. 9). Consultatie van de datafile leerde dat voornamelijk vier soorten verantwoordelijk waren voor het verschil tussen de nieuwe plots van enerzijds MB en anderzijds AB, FDC en RT (Tabel 7).



Figuur 9: De gemiddelde verdeling van het logaritme van de zaaddensiteit over de kalkgraslanden, opgedeeld volgens leeftijd (blauw: nieuwe plots, rood: oude plots). De foutenvlaggen vertegenwoordigen het 95 % betrouwbaarheidsinterval. Voor de volledige naam van de codes voor de kalkgraslanden: zie ondertitel 2.2.

Tabel 7: Aangetroffen zaaddensiteit van de vermelde planten in de zaadbank van de nieuwe plots van Les Abannets (AB), Montagne aux Buis (MB), Fondry des Chiens en Roche trouée (RT).

	<i>Arenaria serpyllifolia</i>	<i>Conyza canadensis</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	<i>Sedum album</i>
MB	14881,46	11300,36	10902,46	7003,04
AB	636,64	79,58	6684,72	0
FDC	238,74	0	2626,14	0
RT	238,74	0	159,16	0

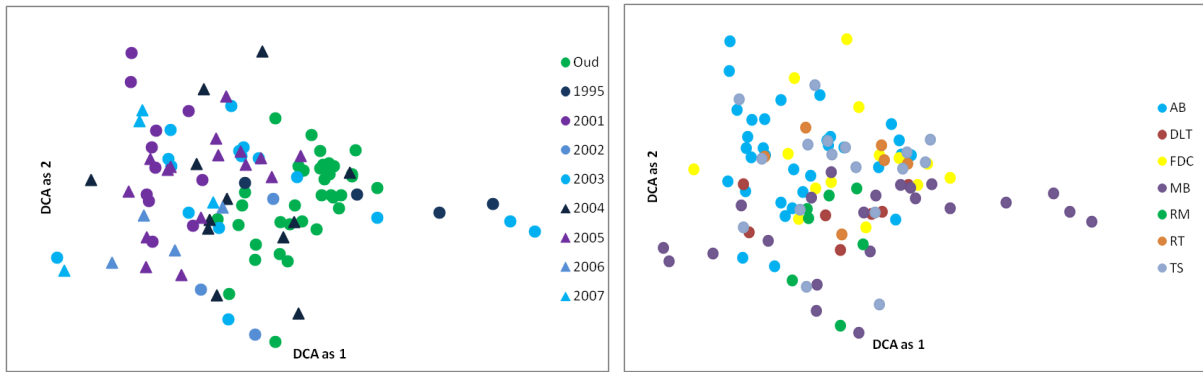
Aan de hand van de indicator analyse werden negen soorten als indicator voor de zaadbank van nieuwe kalkgraslanden gevonden en tien soorten als indicator voor de zaadbank van oude kalkgraslanden (Tabel 8). Er waren echter vele soorten (51) die enkel in de zaadbank van de nieuwe graslanden voorkwamen, en 11 plantensoorten enkel in deze van de oude graslanden.

Tabel 8: Lijst van soorten met significante indicatorwaarden voor nieuwe ('Indicator nieuw') en oude ('Indicator oud') kalkgraslanden. Gras sp. 1 en 2 zijn twee grassoorten die nog niet gedetermineerd waren op het einde van het zaadbankexperiment. De eerste negen soorten zijn indicator voor nieuwe kalkgraslanden. De laatste tien zijn indicator voor oude kalkgraslanden.

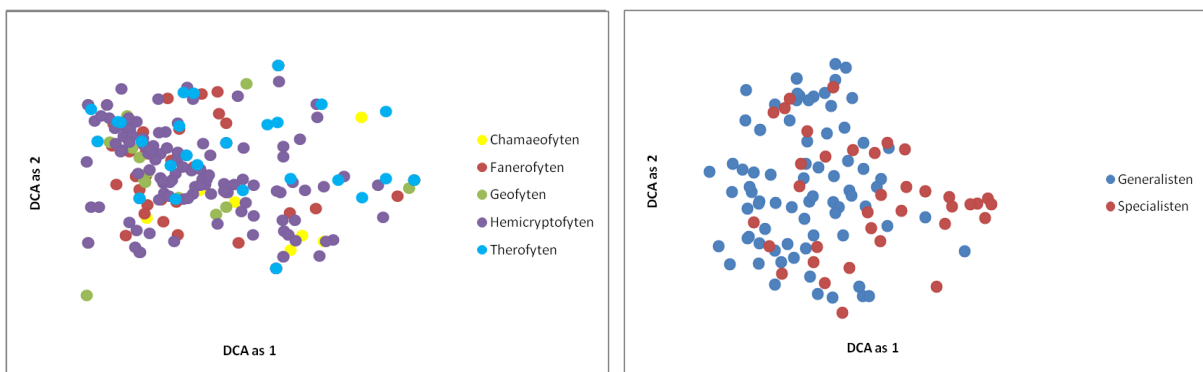
Soort (Latijn)	Soort (Nederlands)	Indicator nieuw	Indicator oud	P-waarde
<i>Daucus carota</i>	Wilde peen	14	0	0,033
<i>Fragaria vesca</i>	Bosaardbei	34	2	0,0074
<i>Myosotis arvensis</i>	Akkervergeet-mij-nietje	13	0	0,047
<i>Plantago major</i>	Grote weegbree	21	1	0,039
<i>Poa annua</i>	Straatgras	16	0	0,023
<i>Poa pratensis</i>	Veldbeemdgras	41	1	<0,0010
<i>Sonchus asper</i>	Gekroesde melkdistel	56	2	<0,0010
<i>Sonchus oleratus</i>	Gewone melkdistel	13	0	0,048
<i>Taraxacum officinalis</i>	Paardenbloem	58	1	<0,0010
<i>Festuca lemanii</i>	Groot schapengras	1	47	<0,0010
<i>Galium pumilum</i>	Kalkwalstro	0	13	0,015
<i>Helianthemum nummularium</i>	Geel zonneroosje	1	36	<0,0010
<i>Pimpinella saxifraga</i>	Kleine bevernel	0	17	0,0018
<i>Potentilla neumanniana</i>	Voorjaarsganzerik	2	41	<0,0010
<i>Sanguisorba minor</i>	Kleine pimpernel	1	39	<0,0010
<i>Teucrium chamaedrys</i>	Echte gamander	0	14	0,014
<i>Thymus praecox</i>	Kruiptijm	0	16	0,002
<i>Poaceae</i> sp. 1	Gras sp. 1	0	13	0,013
<i>Poaceae</i> sp. 1	Gras sp. 2	0	13	0,017

3.2.3 Zaadbank-soortensamenstelling

In de plotordinatie van de zaadbankgegevens werd een trend tot clustering van de oude en de nieuwe plots waargenomen (Fig. 10). De vergelijking van de DCA plotscores van as één tussen oude en nieuwe kalkgraslanden maakte duidelijk dat deze splitsing significant is ($t=6,0$; $p<0,001$). Dit wijst op een verschillende soortensamenstelling tussen de zaadbank van oude en nieuwe graslanden. Een deel van de nieuwe plots vormt bovendien een aparte cluster via de eerste DCA as. Dit blijkt volledig te wijten te zijn aan plots afkomstig van Montagne aux Buis (MB) (Fig. 10). De cluster van MB in de plotordinatie blijkt overeen te komen met specialistische planten bestaande uit hemicryptofyten en chamaeofyten in de soortenordinatie (Fig. 11). De verantwoordelijke soorten hiervoor zijn Kleine steentijm (*Acinos arvensis*), Ruige scheefkelk (*Arabis hirsuta*), Wolfskers (*Atropa belladonna*), Wit vetkruid (*Sedum album*) en Muurpeper (*Sedum acre*). Specialisten en generalisten blijken zowel op oude als op nieuwe graslanden voor te komen (Fig. 11). Voor as twee ($t=0,9$; $p=0,35$) werd echter geen significant verschil gevonden tussen oude en nieuwe plots. Ook worden geen duidelijke clusters gevormd van de graslanden volgens deze as. Ook de plotordinatie van de vegetatiegegevens toont een aparte cluster van Montagne aux Buis (Appendix 3). Bij de soortenordinatie waren geen duidelijke clusters zichtbaar (Appendix 4).



Figuur 10: DCA plotordinatie van de zaadbankgegevens. De linkse grafiek deelt de plots in volgens leeftijd, de rechtse grafiek categoriseert de plots volgens kalkgrasland waarop deze genomen zijn. De eigenwaarden van DCA as 1 en DCA as 2 zijn respectievelijk 0,67 en 0,47.

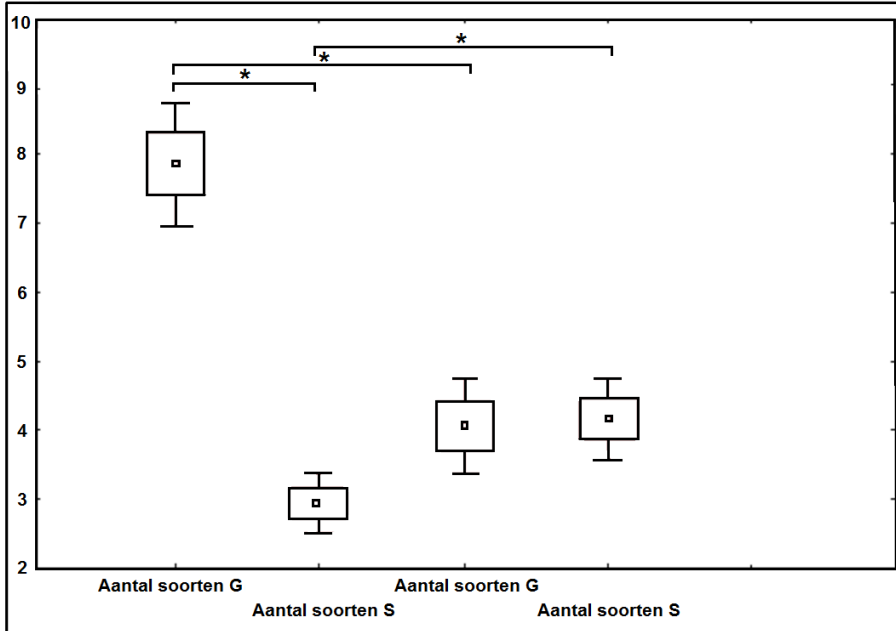


Figuur 11: DCA soortenordinatie van de zaadbankgegevens. De linkse grafiek deelt de soorten in volgens de levensvormen van Raunkiaer, de rechtse grafiek categoriseert de soorten volgens hun specialisatie. Bepaalde punten zijn niet in beide grafieken terug te vinden door een ontbreken van gegevens omtrent de specialisatie of de levensvormen van Raunkiaer voor bepaalde planten. De eigenwaarden van DCA as 1 en DCA as 2 zijn respectievelijk 0,67 en 0,47.

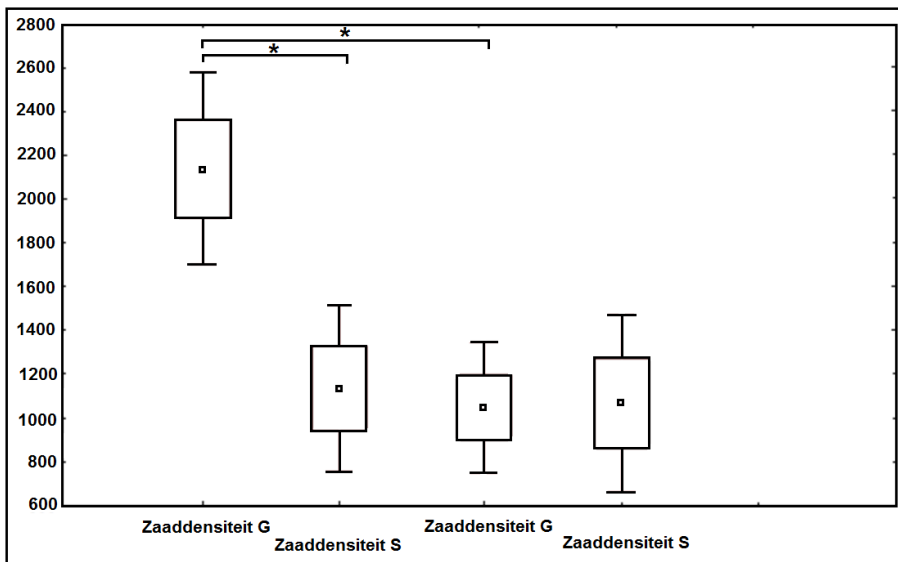
Er werd een significant verschil waargenomen tussen het aantal generalistsoorten en het aantal specialistsoorten op de nieuwe kalkgraslanden ($z=6,3$; $p<0,0010$). Deze bleken significant meer generalistsoorten te bevatten dan specialistsoorten (Fig. 12). Op de oude kalkgraslanden werd echter geen significant verschil waargenomen ($z=0,2$; $p=0,85$). Uit een bijkomende analyse bleek bovendien dat zowel het aantal generalistsoorten ($z=5,1$; $p<0,0010$) als het aantal specialistsoorten ($z=-3,6$; $p<0,0010$) verschilde tussen oude en nieuwe kalkgraslanden. Er bleken gemiddeld meer generalisten op nieuwe kalkgraslanden voor te komen, terwijl op de oude graslanden gemiddeld meer specialisten bleken voor te komen.

De gemiddelde zaaddensiteit van generalisten in vergelijking met specialisten bleek wederom significant te verschillen op de nieuwe ($z=4,9$; $p<0,0010$) graslanden. Er werd een significant hogere zaaddensiteit van generalisten in vergelijking met specialisten teruggevonden (Fig. 13). Op de oude kalkgraslanden bleek de zaaddensiteit niet te verschillen tussen generalisten en specialisten ($z=0,6$; $p=0,54$). De bijkomende analyse

maakte duidelijk dat enkel de zaaddensiteit van generalisten significant verschilde tussen oude en nieuwe graslanden ($z=3,6$; $p<0,0010$). De hoogste densiteit werd op nieuwe kalkgraslanden vastgesteld. De zaaddensiteit van specialisten verschilde niet tussen nieuw en oud ($z=-0,9$; $p=0,36$).



Figuur 12: Verdeling van het gemiddeld aantal soorten generalisten (G) en het gemiddeld aantal soorten specialisten (S) over de kalkgraslanden. De twee linkse boxplots zijn de nieuwe graslanden, de twee rechtse de oude graslanden. De rechthoeken stellen het gemiddelde \pm de standaardfout weer, de verticale foutenvlaggen geven het gemiddelde $\pm 1,96$ keer de standaardfout weer. Een sterretje duidt op een significant verschil.



Figuur 13: Verdeling van de gemiddelde zaaddensiteit van generalisten (G) en specialisten (S) over de kalkgraslanden. De twee linkse boxplots zijn de nieuwe graslanden, de twee rechtse de oude graslanden. De rechthoeken stellen het gemiddelde \pm de standaardfout weer, de verticale foutenvlaggen geven het gemiddelde $\pm 1,96$ keer de standaardfout weer. Een sterretje duidt op een significant verschil.

Voor de analyses betreffende de leeftijden van de kalkgraslanden werden graslanden die in 1995 gerestaureerd zijn uit de datafile verwijderd. Reden was dat er maar vier waarnemingen van waren, en dit de resultaten sterk beïnvloedde. Er werd geen significant verband gevonden tussen de zaaddensiteit of de soortenrijkdom en de leeftijd van het kalkgrasland (Tabel 9). Ook de opdelingen volgens levensvorm of generalist en specialist gaven geen significante correlaties met de graslandleeftijd voor soortenrijkdom of zaaddensiteit (Tabel 9).

Tabel 9: Resultaten van de Spearman rang testen. Als continue variabele werd telkens de leeftijd van de kalkgraslanden genomen (2001 t.e.m. 2007).

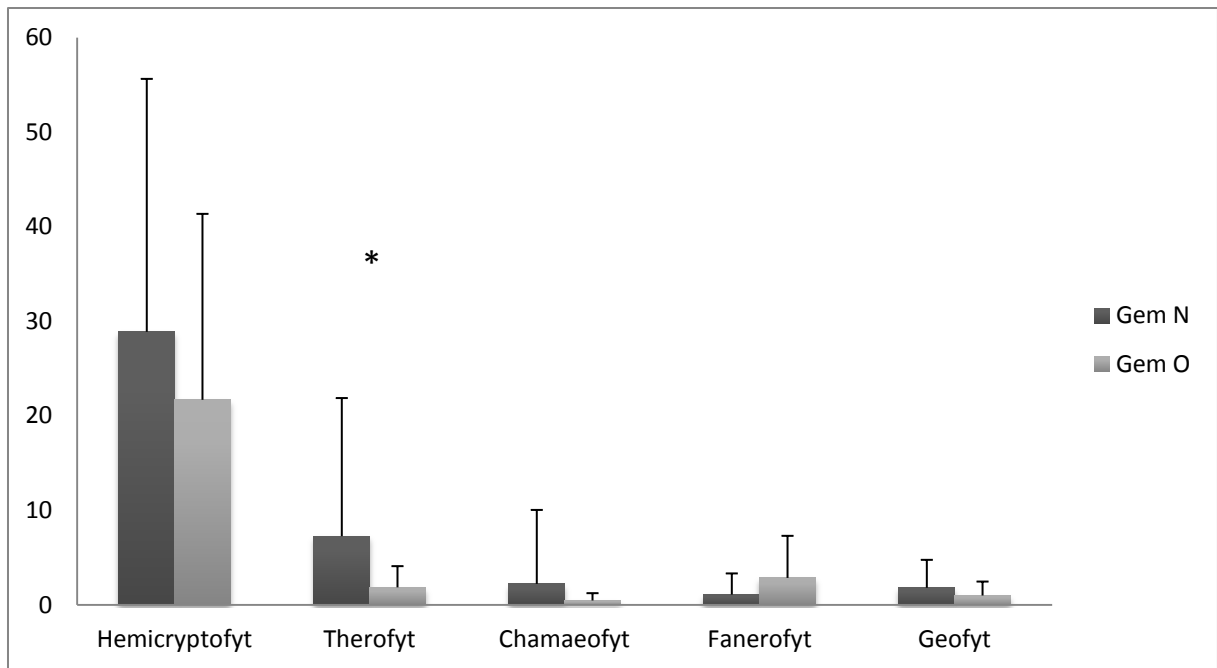
Variabele	Soortenrijkdom		Zaaddensiteit	
	Test stat	P waarde	Test stat	P waarde
Alle kiemplanten	t = 1,02	0,31	t = 0,4	0,71
Hemicryptofyten	t = 0,9	0,38	t = 0,4	0,68
Therofyten	t = 0,5	0,60	t = 1,1	0,27
Chamaeofyten	t = 0,002	0,99	t = -0,04	0,97
Fanerofyten	t = 0,1	0,90	t = -0,1	0,91
Geofyten	t = 0,1	0,90	t = -0,5	0,62
Specialisten	t = -1,2	0,23	t = -1,0	0,34
Generalisten	t = 1,8	0,085	t = 1,5	0,14

Er kiemden significant meer zaden ($\chi^2=251,2$; $p<0,0010$) en soorten ($\chi^2=279,2$; $p<0,0010$) van therofyten en hemicryptofyten dan zaden en soorten van andere levensvormen (Appendix 5). Als we dit vergeleken tussen de zaadbank van oude en nieuwe graslanden bleek dat in vergelijking met oude graslanden, nieuwe graslanden significant meer therofyetzaden en -soorten bevatten. Ook het aantal hemicryptofytsoorten was hoger en het aantal fanerofyetzaden lager voor nieuwe graslanden (Tabel 10, Fig. 14 & 15).

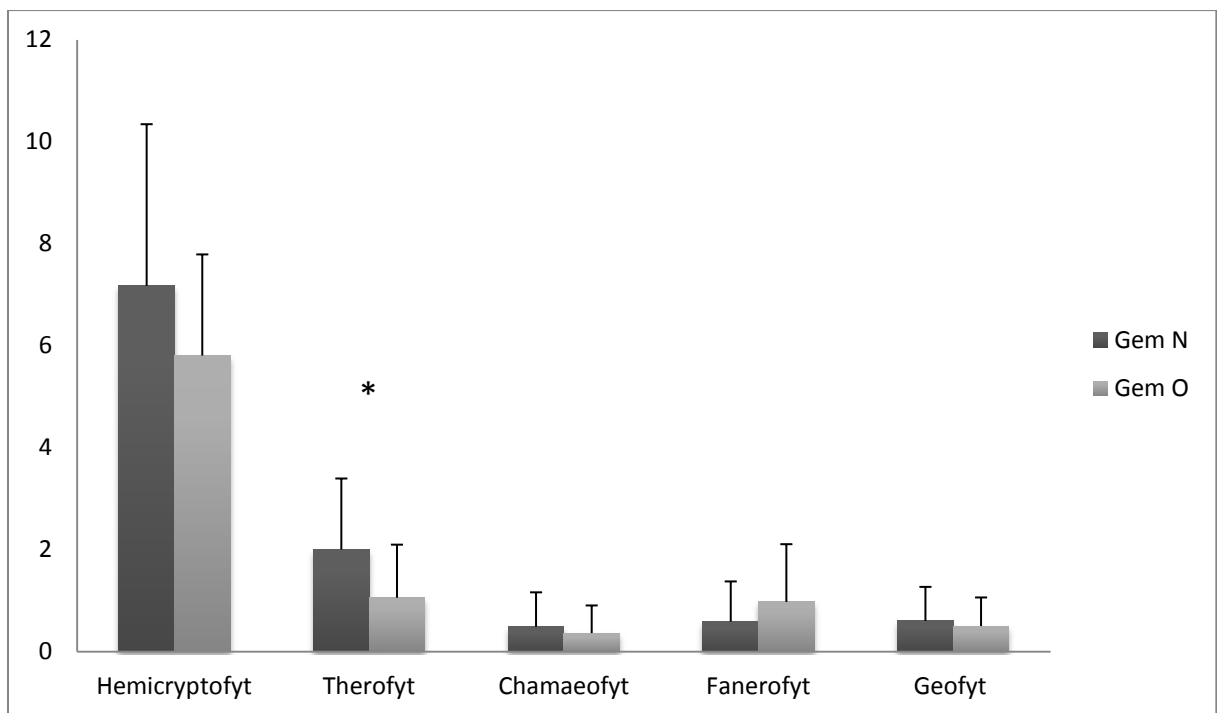
Tabel 10: Resultaten van de Mann-Whitney U testen. Als categorische variabele werd telkens de leeftijd van de kalkgraslanden genomen (oud versus nieuw). Significante waarden zijn in het vetgedrukt cursief weergegeven.

Levensvorm van Raunkiaer	Soortenrijkdom		Zaaddensiteit	
	Test stat	P waarde	Test stat	P waarde
Hemicryptofyten	z = 1,9	0,057	z = 1,2	0,23
Therofyten	z = 3,7	<0,0010	z = 4,0	<0,0010
Chamaeofyten	z = 0,7	0,46	z = 0,9	0,39
Fanerofyten	z = -1,6	0,11	z = -1,8	0,064
Geofyten	z = 0,6	0,57	z = 0,8	0,40

De Chi-kwadraat test leverde geen significant verschil op voor de verhouding van de vertegenwoordiging van de levensvormen van Raunkiaer over generalistische soorten en specialistische soorten ($\chi^2=2,8$; $p=0,60$).



Figuur 14: De vertegenwoordiging van de levensvormen van Raunkiaer over het gemiddeld aantal gekiemde zaden per plot. De verticale foutenvlaggen geven de standaarddeviatie's weer. Een sterretje duidt op een significant verschil.



Figuur 15: De vertegenwoordiging van de levensvormen van Raunkiaer over het gemiddeld aantal teruggevonden plantensoorten in het zaadbankexperiment. De verticale foutenvlaggen geven de standaarddeviatie's weer. Een sterretje duidt op een significant verschil.

3.2.4 Zaadbank-differentiatie

De gemiddelde Euclidische afstand (D_E), de gemiddelde Bray Curtis afstand (D_{BC}), de gemiddelde Euclidische geografische afstand (D_G) en de gemiddelde F_{ST} waarde bleken significant te verschillen tussen oude en nieuwe plots. Zowel de D_E ($z=6,2$; $p<0,0010$), de D_{BC} ($z=3,5$; $p<0,0010$) als de D_G ($z=2,1$; $p=0,038$) bleken een significant hogere waarde te hebben voor nieuwe graslanden. Voor de β_{RC} werd geen significant verschil gevonden tussen oude en nieuwe graslanden ($z=1,8$; $p=0,070$), alhoewel alsook een hogere waarde werd bekomen voor nieuwe graslanden. De F_{ST} waarde daarentegen bleek een significant lagere waarde te hebben voor nieuwe graslanden ($z=-4,1$; $p<0,0010$). Er werd geen significante isolatie-door-afstand geobserveerd voor nieuwe graslanden of voor alle graslanden te samen. Echter, voor de oude graslanden werd wel een marginaal significante isolatie-door-afstand geobserveerd voor twee van de vier afstandsmaten (Tabel 11).

Tabel 11: Resultaten van de uitgevoerde Manteltesten tussen de Euclidische geografische afstand (D_G) en de zaadbank soortensamenstellingsafstand (D_E , D_{BC} , F_{ST} en β_{RC}). Voor de F_{ST} was geen matrix beschikbaar voor de oude en de nieuwe plots tezamen. De resultaten zijn weergegeven voor zowel alle kalkgraslanden tezamen (O+N), enkel de oude (O) en enkel de nieuwe (N) kalkgraslanden. Significante waarden staan in cursief en zijn vetgedrukt.

	D_E		D_{BC}		F_{ST}		β_{RC}	
	<i>R_M</i>	<i>P waarde</i>	<i>R_M</i>	<i>P waarde</i>	<i>R_M</i>	<i>P waarde</i>	<i>R_M</i>	<i>P waarde</i>
D_G (O+N)	0,06	0,16	-0,03	0,20	/	/	0,03	0,21
D_G (O)	0,2	0,06	0,05	0,20	-0,04	0,36	-0,1	0,054
D_G (N)	0,03	0,30	-0,04	0,18	-0,07	0,15	0,03	0,28

3.2.5 Gelijkenis vegetatie en zaadbank

De Manteltest aan de hand van D_E toonde een significant verband tussen de vegetatie- en de zaadbanksoortendissimilariteit van de nieuwe graslanden ($R_M=0,22$; $p=0,010$). Ook aan de hand van de D_{BC} ($R_M=0,31$; $p<0,0010$) en de β_{RC} afstandsmatrix ($R_M=0,25$; $p<0,0010$) werd voor de nieuwe graslanden een significant verband vastgesteld. Voor de gereduceerde datafile van de vegetatieopnamen werd de correlatie tussen beide afstandsmatrices aan de hand van D_E slechts marginaal significant ($R_M=0,14$; $p=0,070$). Via D_{BC} ($R_M=0,30$; $p<0,0010$) en de β_{RC} matrix ($R_M=0,25$; $p<0,0010$) werd wel terug een significante correlatie ontdekt. Merk nogmaals op dat er geen vegetatieopnamen voorhanden waren voor de oude graslanden, zodat deze niet werden opgenomen in deze analyses.

4. Discussie

4.1 Plantenkenmerken-analyse

Aan de hand van de levensvormen van Raunkiaer werden duidelijke verschillen waargenomen in de zaadlanglevendheid. Dit bleek gekoppeld te zijn aan een aantal plantenkenmerken dewelke verschillen tussen deze levensvormen.

Therofyten (ruderalen volgens Grime (1977)) hebben een hogere zaadlanglevendheid (zie ook Raunkiaer (1937)). Dit is onder andere gekoppeld aan kleinere zaden, een vroege leeftijd van eerste bloei, een kortere levensduur, kleinere planten en een grotere zaadproductie. Onze bevindingen omtrent de afmetingen van de zaden komen overeen met resultaten uit eerder onderzoek (Bekker *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1993). De auteurs vonden dat kleinere en lichtere zaden een langere levensduur hebben. Westoby (1998) toonde bovendien aan dat kleinere zaden typerend zijn voor planten die aangepast zijn aan verstoringen (therofyten). Dit is ook zichtbaar in de biplot als een trend van de therofytencluster naar het gedeelte van hoge zaadleeftijd. Dit kan een verklaring bieden voor de langlevendheid van hun zaden in vergelijking met geofyten, hemicryptofyten en fanerofyten. Dit zijn allemaal twee- of meerjarige planten. Voor stresstolerante en competitieve planten worden geen langlevende zaden verwacht. Deze hebben immers meestal langlevende ondergrondse organen (zoals wortels en knollen) als 'voorraad' in plaats van zaden (Grime, 1977). De hoge levensduur van zaden van planten die snel bloeien en een korte levensduur hebben kan verklaard worden door het CSR model van Grime (1977). Ruderale planten groeien en bloeien zeer snel, omdat optimale condities maar tijdelijk zijn. Deze planten moeten dus zo snel mogelijk bloeien en zaad zetten om hun overleving te verzekeren. Onderzoek van Leishman *et al.* (1995) toont dat zaadgrootte sterk geassocieerd is met planthoogte. Gemiddelde zaadmassa steeg samen met planthoogte tot 10 meter. Soorten die een persistente zaadbank opbouwen zijn dus over het algemeen kleinere planten. Westoby (1998) stelt dat de hoogte van de plant in relatie staat tot de hoeveelheid verstoring waaraan de plant onderworpen is. Verstoringplanten (therofyten/ruderalen) zullen dus over het algemeen kleinere zaden produceren. Jakobsson en Eriksson (2000) vonden bovendien een *trade-off* tussen de zaadgrootte en het aantal zaden van een plant. Planten met een hoge fecunditeit (therofyten) zullen dus over het algemeen kleinere zaden produceren, wat met een hogere zaadlevensduur geassocieerd kan worden.

Ook een kleinere bladoppervlakte en een hogere licht- en nutriëntenvoorkeur zijn gekoppeld aan de hogere zaadlanglevendheid van therofyten. Cornelissen (1999) vond een triangulaire relatie tussen zaadgewicht en bladoppervlakte bij (dwerg)struiken en bomen. Planten met zware zaden hadden grote bladeren en planten met lichtere zaden hadden ofwel grote ofwel

kleine bladeren. Bij typische struiken en bomen van kalkgraslanden werden echter enkel lichte zaden teruggevonden bij planten met kleine bladeren. De hogere Ellenberg licht- en stikstofwaarden bij soorten die zaden met een langere levensduur produceren kunnen waarschijnlijk aan de hand van het model van Grime (1977) verklaard worden. Soorten die langlevende zaden produceren werden eerder al in verband gebracht met de ruderaal strategie, die gekenmerkt wordt door licht- en stikstofminnende soorten (therofyten).

Om het verband van langlevende zaden met endozoöchorie te verklaren doen we beroep op Kuiters en Huiskes (2010). Deze auteurs vonden dat er meer kleinere zaden (met een hogere levensduur) in schapenmest terug te vinden waren in kalkgraslanden in Zuid-Limburg. Dit komt volgens de auteurs omdat kleinere zaden meer kans hebben om ongeschonden het spijsverteringsstelsel van de dieren door te komen. Pakeman *et al.* (2002) suggereren dat de adaptatie van zaden om vertering door het spijsverteringsstelsel te overleven gelijkaardig zou kunnen zijn aan de adaptaties die nodig zijn om in de zaadbank te kunnen overleven. Bruun en Poschlod (2006; fide Kuiters & Huiskes, 2010) geven als bijkomende verklaring dat kleinere zaden in grotere aantallen worden geproduceerd. Ze vonden een positieve relatie tussen zaadproductie per eenheid gebied en zaadaantallen in koeienmest. We kunnen dus aannemen dat planten die zaden produceren die via endozoöchorie gedisperseerd worden over het algemeen meer en kleinere zaden produceren die een langere levensduur hebben. Ook epizoöchore planten blijken zaden van langere levensduur te hebben dan niet epizoöchore planten. Ook hier zijn de afmetingen van het zaad een sleutelfactor. Uit een studie van Römermann *et al.* (2005) blijkt dat kleine zaden veel meer aan verbreiding onderworpen zijn via epizoöchorie door middel van schapenwol en koeienvacht dan grote zaden.

4.2 Zaadbankexperiment

4.2.1 Verloop

De soort die kiemde in de controlebak (*Juncus bufonius*) laten we buiten beschouwing bij het interpreteren van de resultaten. Deze soort werd in geen enkele andere bak waargenomen. Onze resultaten worden hier bijgevolg niet door beïnvloed. De koudebehandeling zorgde niet voor de kieming van veel nieuwe plantensoorten, maar wel voor vele nieuwe kiemplanten (vnl. *Carex flacca*, *Medicago lupulina* en *Viola hirsuta*). Dit duidt erop dat plantensoorten een dormantie opleggen voor een deel van hun zaden, zodat korte periodes van gunstige omstandigheden voor kieming overbrugd kunnen worden (Vleeshouwers *et al.*, 1995). Bossuyt *et al.* (2006), die ook onderzoek deed naar de zaadbanksamenstelling van kalkgraslanden in de Viroinvlei, vermeldt niet hoeveel nieuwe soorten kiemden na de koudebehandeling. Wel bleek ongeveer dezelfde verhouding van zaden te kiemen na de

koudebehandeling als in ons experiment (ongeveer 1/5 van de zaden). De koudebehandeling blijkt dus een gunstig effect te hebben gehad op de totale zaadkieming.

In ons onderzoek blijken zeer veel soorten gekiemd te zijn (n=134) in vergelijking met ander zaadbankonderzoek op kalkgraslanden (Tabel 12). Er werden geen studies aangetroffen waarin een vergelijkbaar aantal soorten in de zaadbank van kalkgraslanden werd aangetroffen. De vele grondboringen (4720) in vergelijking met andere studies hebben waarschijnlijk bijgedragen tot dit groot aantal teruggevonden soorten. Het gebruik van soorten-verzadingscurves, zoals Plue en Hermy (2012) deden om na te gaan hoeveel grondboringen nodig zijn om zoveel mogelijk soorten te ontdekken, zou tot hogere soortenaantallen kunnen leiden. De gemiddelde zaaddensiteit die in deze studie werd aangetroffen (2963 zaden/m²) blijkt echter wel overeen te komen met de resultaten uit ander onderzoek op kalkgraslanden (Tabel 12). Twee studies blijken echter een lagere zaaddensiteit te hebben aangetroffen. Een beperkter aantal boringen, maar ook een hogere predatie van de zaden, de aanwezigheid van minder ruderaal soorten en minder persistente zaden in de zaadbank zijn mogelijke verklaringen. Kalamees *et al.* (2012) blijkt een zeer hoge zaaddensiteit terug te vinden. Deze auteurs gebruikten wel een kleiner aantal, grote stalen. Mogelijks leidde het toevallig nemen van stalen op plaatsen waar een clustering van zaden plaatsvond tot de hogere zaaddensiteit. Plue *et al.* (2010a) raden omwille van die reden het gebruik aan van een groter aantal kleine stalen.

Tabel 12: Enkele data uit onderzoek naar de zaadbank van kalkgraslanden. A: Willems & Bik (1998), B: Bossuyt *et al.* (2006), C: Kalamees & Zobel (2002), D: Akinola *et al.* (1998), E: Jacquemyn *et al.* (2011), F: Kalamees *et al.* (2012).

	A	B	C	D	E	F
Land van staalname	Nederland	België	Estland	GB	België	Estland
Regio van staalname	Gerendal	Viroin	Laelatu	Derbyshire	Voeren	Haavakannu
Aantal boringen	160	500	1000	450	300	80
Oppervlakte grondboor	7,1cm ²	4,9cm ²	12,6cm ²	21,2cm ²	4,9cm ²	100cm ²
Koudebehandeling	Nee	Ja	Nee	Nee	Ja	Nee
Totaal aantal soorten	32	42	51	45	32	66
Zaaddensiteit (zaden/m²)	770	930	2362	2549	2994	11302

Mogelijk zou een warmtebehandeling hebben geleid tot een nog hoger aantal gekiemde zaden en soorten. Zoals eerder aangehaald, vonden Bossuyt en Honnay (2008b) een hoger aantal soorten en zaden nadat de stalen aan een warmtebehandeling werden onderworpen. In het experiment werden echter wel driemaal zoveel warmtebehandelingen toegepast als de controle zaadbankmethode. Mogelijk leidde dit ook tot het logischerwijze ontdekken van meer soorten (Bossuyt & Honnay, 2008b). In totaal werden door Bossuyt en Honnay 25

soorten enkel aangetroffen in verwarmde stalen. Een vergelijking met onze resultaten toonde dat van deze soorten er 20 in ons experiment kiemden, zonder warmtebehandeling. Slechts twee typische kalkgraslandsoorten, namelijk Verfbrem (*Genista tinctoria*) en Trosgamander (*Teucrium botrys*) werden niet waargenomen in dit experiment. Een warmtebehandeling zal dus waarschijnlijk leiden tot een verhoogd aantal gekiemde zaden eerder dan een significant hoger aantal soorten. Meer onderzoek naar de doeltreffendheid van een warmtebehandeling op zaadkieming van de zaadbank van kalkgraslanden is echter nodig voor een grotere zekerheid.

De soorten die het meest werden aangetroffen in onze studie komen overeen met deze uit het experiment van Bossuyt *et al.* (2006) dat ook op de Viroin werd uitgevoerd. *H. perforatum*, *P. neumanniana*, *H. nummularium* en *A. serpyllifolia* werden respectievelijk als meest voorkomende soorten in de zaadbank aangetroffen. Ook Kalamees *et al.* (2012) vond *A. serpyllifolia* als één van de meest voorkomende soorten in de zaadbank van kalkgraslanden (Estland). Kalamees en Zobel (2002) daarentegen vonden dat Zegges (*Carex* sp.) het meest vertegenwoordigd waren in de zaadbank van kalkgraslanden in Estland (ongeveer 50% van de zaden). Dit illustreert dat de zaadbank sterk afhangt van plaatselijke soorten met een grote zaadproductie (zoals bijvoorbeeld *Conyza canadensis* en *Hypericum perforatum* in ons geval).

De resultaten toonden geen verschillen in soortensamenstelling en zaaddensiteit tussen de drie bekeken diepten. Waarschijnlijk komt dit doordat de kalkgraslanden van de Viroinvallei vrij ondiepe bodems hebben (vaak minder dan 15cm diep). Hierdoor verwachtten we ook minder gelaagdheid en een mindere verdeling van de zaden over de diepten dan voor plaatsen met diepere bodems. Het feit dat de soortensamenstelling en het aantal zaden niet significant verschilde tussen de verschillende bodemstalen per plot bevestigt de resultaten van Bekker *et al.* (1998). We veronderstelden immers dat de meeste zaden zich oppervlakkig zouden bevinden. De auteurs stelden vast dat er zich maar weinig zaden dieper dan 5cm in de bodem bevinden. Ook zal het stenige substraat waarschijnlijk als een barrière functioneren voor de zaden, waardoor deze accumuleren in de ondiepe bodem (Bossuyt *et al.*, 2006).

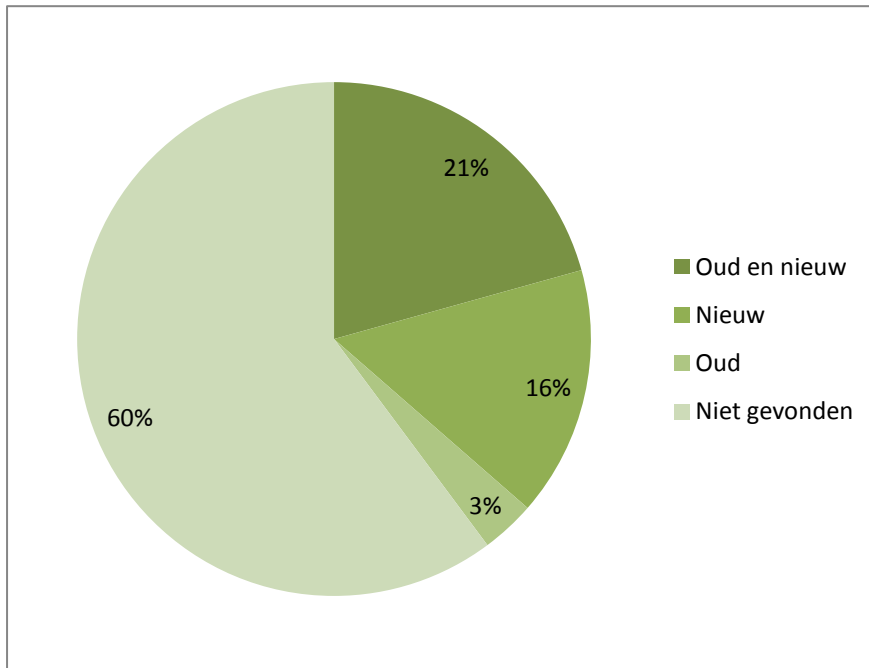
In deze studie werden, logischerwijze, voornamelijk zaden van planten aangetroffen met een hoge tot gemiddelde zaadlevendheid (Appendix 6). Weinig zaden van planten met een lage zaadlevendheid werden gevonden, terwijl een groot aandeel van de planten in de vegetatie van de bestudeerde graslanden zaden produceert met een langlevendheid van 0,25 of kleiner (transiënte zaden).

4.2.2 Zaadbankdiversiteit en -soortensamenstelling

Onze studie toonde duidelijk grote verschillen aan tussen de zaadbanksamenstelling van oude en nieuwe graslanden. De zaadbank van nieuwe graslanden wordt gekenmerkt door een hogere soortenrijkdom en zaaddensiteit dan de zaadbank van oude graslanden. Dit uit zich ook in de hogere Shannon-Wiener diversiteit voor nieuwe graslanden. Een groot aandeel soorten kwam ook enkel voor op de nieuwe kalkgraslanden (Fig. 16). Ook Kalamees en Zobel (1998) vonden minder soorten in een oud kalkgrasland in vergelijking met een kalkgrasland dat 20 jaar geleden gerestaureerd was. Ze verklaren dit door het feit dat vele soorten uit de oude graslandgemeenschap een transiënte zaadbank hebben. Piqueray *et al.* (2011) vond dat de bedekking van ruderalen zeer hoog was in de periode na de restauratiewerken (2-4 jaar) op bepaalde kalkgraslanden van de Calestienne (waaronder ook in de Viroinvalllei). In de daaropvolgende elf jaar bleek dit aandeel echter terug te dalen. Het aandeel aan typische graslandsoorten bleek daarentegen laag te zijn in de periode na de restauratiewerken (2-4 jaar), terwijl dit de volgende elf jaar sterk toenam (zie ook Helsen *et al.*, 2013). In onze studie zien we ook dat deze hogere soortenrijkdom in de zaadbank van nieuwe graslanden voornamelijk verklaard wordt door een hoger aandeel generalisten, en meer specifiek ruderaal soorten (therofyten). Deze zorgen voor het groot aandeel soorten dat enkel op de nieuwe graslanden werd aangetroffen (Fig. 16). Ook Fagan *et al.* (2009) vond een hogere aanwezigheid van therofyten in de bodem van gerestaureerde kalkgraslanden. Dit komt doordat de condities net na de restauratiewerken in de Viroin ideaal waren voor deze pioniersplanten/ruderaal soorten. De verstoring (verwijderen van bomen en struiken) zorgde immers voor een vegetatieloze, open bodem met veel lichtinval en een tijdelijk verhoogde stikstofhoeveelheid. Het vrijstellen en omwoelen van de bodem door de werkzaamheden zorgde op die manier voor een grote instroom van de mobiele zaden van vele ruderaal soorten op de huidige nieuwe kalkgraslanden, die na hun bloei de zaadbank snel aanvulden.

De overige soorten die aanwezig waren op zowel de oude als nieuwe graslanden bestonden voornamelijk uit echte graslandsoorten (hemicryptofyten) (zie ook appendix 9). Ook Milberg en Hansson (1993) vonden dat de meeste soorten en zaden in de zaadbank van een kalkgrasland in Zweden hemicryptofyten waren, gevolgd door therofyten. Fanerofyten en geofyten blijken echter een hogere soortenrijkdom te hebben in de vegetatie in vergelijking met therofyten (Appendix 8). Dit wijst op de lagere investeringen in zaden van deze twee levensvormen (cf. Raunkiaer, 1937; zie ook plantenkenmerkenanalyse). Fagan *et al.* (2008) vond dat een groot aantal planten uit oude graslanden meerjarige hemicryptofyten waren. Vele van deze planten bleken zich ook deels vegetatief voort te planten. De gerestaureerde graslanden daarentegen werden gekenmerkt door een zaadbank als regeneratiestrategie. De zaadbank van deze kalkgraslanden bleek ook persistenter te zijn dan die van de oude

kalkgraslanden. De planten van de gerestaureerde kalkgraslanden bleken eerder geassocieerd te zijn met een therofytische levensvorm. Net zoals Bossuyt *et al.* (2006) vonden we een lager aandeel aan kalkgraslandspecialisten in vergelijking met generalisten in de zaadbank van zowel oude als gerestaureerde graslanden (zie ook appendix 7). Toch werden vele soorten die duiden op kalkgraslanden waargenomen.



Figuur 16: Taartdiagram betreffende de verdeling van de aangetroffen zaden over de kalkgraslanden. 'Oud en nieuw': procent soorten dat zowel in de zaadbank van oude als van nieuwe kalkgraslanden werd aangetroffen. 'Nieuw': procent soorten dat enkel in de zaadbank van nieuwe kalkgraslanden werd aangetroffen. 'Oud': procent soorten dat enkel in de zaadbank van oude kalkgraslanden werd aangetroffen. 'Niet gevonden': procent soorten van de 308 plantensoorten die geobserveerd werden op de onderzochte kalkgraslanden, dat niet werd aangetroffen in de zaadbank. 16 plantensoorten die kiemden tijdens het zaadbankexperiment werden niet in de lijst teruggevonden. In totaal werden 134 soorten aangetroffen in de zaadbank.

We kunnen stellen dat er op de gerestaureerde kalkgraslanden *assembly* plaatsvindt. De zaadbank wordt na verstoring aangevuld met nieuwe soorten, vanuit de omgeving. Op de oude kalkgraslanden zullen de therofytische soorten/ruderalen echter verdwijnen uit de zaadbank (*disassembly*). Na enkele jaren zullen de condities op de gerestaureerde kalkgraslanden immers minder geschikt worden voor ruderaal planten, waardoor deze geleidelijk aan zullen verdwijnen uit de vegetatie. Er zal dus weinig nieuwe inbreng van zaden van deze planten plaatsvinden. Nadat oude graslanden verruigd werden, of nadat deze beplant werden met naaldbos gingen zaden verloren naargelang hun langlevendheid. Na herstel worden dus in de zaadbank enkel nog soorten verwacht van langlevende graslandsoorten of soorten die onder het bos konden verjongen. Ook Royo en Ristau (2012) vonden over een chronosequentie in een bos dat de soortensamenstelling in de zaadbank na verloop van tijd overgaat tot een beperkte set van soorten met de langste zaadlanglevendheden. De meeste soorten die in ons experiment aanwezig waren in de

zaadbank van de oude kalkgraslanden blijken ook in de nieuwe aanwezig te zijn (Fig. 16). Vele typische graslandsoorten werden dus ook in de zaadbank van de nieuwe graslanden aangetroffen door deze *assembly*. Slechts weinig soorten werden enkel in de zaadbank van oude graslanden aangetroffen (Fig. 16). Dit bleken echter voornamelijk specialisten te zijn zoals *Echium vulgare*, *Genista sagittalis*, *Globularia punctata*, *Knautia arvensis* en *Pimpinella saxifraga*. Ook de gekende indicatorsoorten voor de zaadbank van oude kalkgraslanden bleken allemaal specialisten (en vnl. hemicryptofyten) te zijn. Deze droegen bij aan het gemiddeld hoger aantal specialistensoorten in de zaadbank van oude kalkgraslanden. We verwachtten dat deze na verloop van tijd op de nieuwe graslanden zullen terecht komen. De indicatorsoorten voor de zaadbank van de nieuwe kalkgraslanden daarentegen bleken voornamelijk generalisten te zijn.

De *disassembly* werd echter niet waargenomen betreffende de tijdsanalyse. Zowel het aantal plantensoorten en de zaaddensiteit in de zaadbank als de opdelingen volgens levensvorm of generalist en specialist stonden niet lineair in verband met de leeftijd van de nieuwe kalkgraslanden. Afgaande op onder andere de sequentiële vervanging van generalisten door specialisten in de vegetatie die Helsen *et al.* (2013) waarnamen, verwachtten we echter dat het aantal generalistenzaden ook zou afnemen met de tijd sinds restauratie. Ook Fagan *et al.* (2008) vond dat de vegetatie in gerestaureerde sites een tendens bleek te vertonen om minder ruderaal soorten en meer meerjarige planten te bevatten met de tijd. De zaadbank werd ook minder persistent met de tijd. In ons onderzoek werd dit fenomeen mogelijks niet aangetroffen door het relatief korte tijdsinterval tussen pas gerestaureerde en langer geleden gerestaureerde kalkgraslanden. Ook het klein aantal bestudeerde graslanden kan een verklaring geven. Piqueray *et al.* (2011) vond een relatief snelle verandering in de vegetatiesamenstelling met de tijd sinds restauratie. In de zaadbank zal dit verschijnsel pas op langere termijn merkbaar worden. De persistente zaden die in massale hoeveelheden geproduceerd werden in de initiële periode na restauratie zullen immers nog lang in de bodem aanwezig blijven. Pas na langere tijd zal dit aantal afnemen (Bakker *et al.*, 1996)

Het grasland Montagne aux Buix (MB) had een duidelijk afwijkende soortensamenstelling en hoeveelheid zaden in vergelijking met de andere graslanden. Dit werd echter ook weerspiegeld in de vegetatieopnamen. MB is immers gekend als een bijzonder grasland omdat het vele soorten bevat die op andere plaatsen in de Viroin niet voorkomen. Specialistische soorten zoals *Clinopodium acinos*, *Arabis hirsuta*, *Atropa belladonna*, *Sedum acre* en *Sedum album* werden enkel hier aangetroffen in de zaadbank. Dit kan mogelijks verklaard worden door een iets wat andere bodemsamenstelling, een andere expositie of een andere geschiedenis van dit grasland. Zo zijn grote delen van dit grasland zeer ondiep,

en sterk zuidelijk geëxposeerd, wat leidt tot vrij open vegetaties met een groter aandeel therofyten.

4.2.3 Zaadbank-differentiatie

Onze resultaten geven aan dat zowel de gemiddelde Bray Curtis afstand, de gemiddelde Euclidische afstand als de gemiddelde Euclidische geografische afstand een significant hogere waarde hebben voor nieuwe graslanden. De zaadbanksamenstelling van nieuwe graslanden verschillen onderling dus sterker dan van de oude graslanden op basis van de D_E , D_{BC} en de β_{RC} (deze laatste was marginaal significant). Plue *et al.* (2010b) vond een gelijkaardig resultaat in de zaadbank van een bos in Noord-Duitsland. De zaadbank van de oudere delen uit het bos bleek meer gelijkend te zijn dan deze van jongere delen van het bos (convergentie). De auteurs verklaren dit door een lage zaadinbreng vanuit de struiklaag en depletie van de zaadbank. De transiënte zaden zullen namelijk verdwijnen na verloop van tijd (*disassembly*). Ook in ons onderzoek is er een verschil tussen de nieuwe kalkgraslanden in soortensamenstelling. Het lokaal meer voorkomen van bepaalde therofytensoorten (in het totaal werden 24 therofytensoorten aangetroffen) zorgde hier waarschijnlijk voor de verschillen van soorten in de zaadbank. Het hoge aandeel aan *Arenaria serpyllifolia* op MB is hier een voorbeeld van. Helsen *et al.* (2012) wijten deze lokale verschillen tussen nieuwe graslanden aan toevalseffecten tijdens de initiële kolonisatie van planten. Hoogst waarschijnlijk is ook in dit geval het plaatselijk meer voorkomen van bepaalde therofyten en generalisten de reden van het verschil in de periode na restauratie. Door de significant hogere waarde voor de D_G voor nieuwe graslanden is het echter ook mogelijk dat de soortensamenstelling sterker verschilt omwille van de grotere geografische afstand tussen de graslanden.

De gemiddelde divergentie in lokale soorten bedekking (F_{ST} waarde) betreffende de zaden blijkt echter een significant lagere waarde te hebben voor nieuwe kalkgraslanden in vergelijking met oude graslanden. In de nieuwe plots zal de lokale verdeling van de zaden van de verschillende plantensoorten zal dus eerder uitgemiddeld worden in plaats van dat zaden van sommige soorten meer dominant zullen voorkomen in bepaalde plots. In de verscheidene oude plots zullen echter verschillende soorten dominant worden. Mogelijks is dit deels te wijten doordat er meer soorten aanwezig zijn op de nieuwe graslanden in vergelijking met de oude. Het plaatselijk voorkomen van meer soorten kan de F_{ST} immers beïnvloeden (Giles & Goudet, 1997). Baeten *et al.* (2010) ontdekte hetzelfde betreffende de vegetatiesamenstelling in bossen in Vlaanderen. Er werd namelijk een stijging van de F_{ST} met de leeftijd van het bos waargenomen.

Voor nieuwe kalkgaslanden blijkt geen duidelijk effect van geografische afstand te zijn op de zaadbanksamenstelling. Een 'isolation-by-distance' werd hier dus niet aangetroffen. Generalistische soorten komen vanuit de matrix (akkers, bosranden,...) op de kalkgaslanden terecht. Deze habitattypes zijn echter niet geassocieerd met kalkgaslanden, en dus hangen deze soorten niet samen met de isolatie van de graslanden. Op de oude graslanden daarentegen bevinden zich meer typische graslandsoorten. Hiervan verwachtten we van sommige dat ze effecten zouden ondervinden door de isolatie van de graslanden. Dit was zichtbaar in de D_E en de β_{RC} , dewelke marginaal significant in verband stonden met de D_G voor de oude graslanden.

4.2.4 Gelijkenis vegetatie en zaadbank

De resultaten geven aan dat zowel met de D_E , de D_{BC} als met de β_{RC} een significant verband tussen de vegetatie- en de zaadbanksoortendissimilariteit van de nieuwe graslanden werd aangetroffen. Dit komt hoogst waarschijnlijk door zowel het hoge aandeel therofytische planten in de vegetatie als in de zaadbank op gerestaureerde graslanden. Uit een meta-analyse van Hopfensperger (2007) blijkt echter dat de gelijkenis tussen graslanden en hun zaadbank stijgt met de leeftijd van de systemen. De soortenrijkdom blijkt over het algemeen laag te zijn tijdens de initiële condities na de verstoring. Doordat zaden van vele graslandplanten dichtbij de moederplant disperseren zal de zaadbank weinig verscheidene soorten bevatten na dergelijke verstoring. Met de tijd zullen bovengrondse en ondergrondse soortendiversiteit toenemen. Ook Bossuyt en Hermy (2004) vonden dat de gelijkenis tussen de vegetatie en de zaadbank groter was in oudere duingraslanden dan in jonge. De korte verbreidingsafstanden van de zaden van typische graslandsoorten zorgde voor de hoge gelijkenis tussen de zaadbank en de vegetatie. Op kalkgaslanden blijkt echter uit onderzoek een ander patroon aanwezig te zijn. Kalamees en Zobel (1997) en Wagner *et al.* (2003) vonden een daling in gelijkenis tussen de vegetatie en de zaadbank van kalkgaslanden met de tijd. Ook Fagan *et al.* (2009) vond een groter verschil tussen vegetatie en zaadbank in oude kalkgaslanden in vergelijking met de gerestaureerde. Dit verklaren ze door de transiënte aard van de zaadbank van vele kalkgaslandspecialisten.

We verwachtten dus dat we het significant verband tussen de vegetatie- en de zaadbanksamenstelling in oude kalkgaslanden niet meer zouden aantreffen. Zo deed Helsen *et al.* (2012) onderzoek op de vegetatiesamenstelling van kalkgaslanden in de Viroinstreek (dewelke deels ook de graslanden omvatten die in deze studie bekeken werden). Er bleek een divergentie van de vegetatie op te treden met de tijd sinds restauratie. Meer specifiek vond Helsen *et al.* (2013) dat over een chronosequentie van gerestaureerde kalkgaslanden in de Viroin bij het samenstellen van de vegetatiegemeenschappen een sequentiële vervanging plaatsvond van generalisten door specialisten. Dit maakt dat de zaadbank

(dewelke zal convergeren met de tijd sinds restauratie) waarschijnlijk meer en meer zal verschillen van de vegetatie. Door het ontbreken van vegetatieopnamen op de oude kalkgraslanden kunnen we deze hypothese echter niet toetsen.

4.2.5 Suggesties voor beheer en beleid

De fragmentatie van kalkgraslanden in de Viroin is stopgezet, en talrijke restauratiewerken werden uitgevoerd. Ook werd geen extinctieschuld (meer) ontdekt werd door Adriaens *et al.* (2006). Normaal zou dergelijke schuld zorgen voor een achteruitgang van de typische specialisten zoals op kalkgraslanden in de Lessevallei het geval is (Piqueray *et al.*, 2011). We verwachten dus geen verdere daling van het aantal specialistische kalkgraslandplanten. Bepaalde maatregelen zullen echter nodig zijn om sommige van deze soorten terug te laten voorkomen op gerestaureerde graslanden. Toch werden in onze studie een groot aantal specialistische soorten (n=32) aangetroffen in de zaadbank van de gerestaureerde graslanden, waaronder *Acinos arvensis*, *Arabis hirsuta*, *Atropa belladonna*, *Helianthemum nummularium*, *Carex flacca*, *Sedum acre*, *Veronica officinalis* en *Veronica serpyllifolia*. Een deel van deze soorten is waarschijnlijk nog afkomstig uit de zaadbank van voormalige oude kalkgraslanden die bebost werden. Zo vond Kalamees *et al.* (2012) een grote zaaddensiteit in kalkgraslanden in Estland die zelfs tot 50 jaar geleden verlaten waren (dewelke geëvolueerd waren tot een Hazelaar-Jeneverbes struweel). Ook werd nog steeds een hoog aandeel typische graslandsoorten gevonden. Mogelijk kan dit verklaard worden aan de hand van de studie van Kalamees en Zobel (1997). Deze auteurs vonden dat de zaadbank in een naaldbos op een voormalig kalkgrasland dat 30 tot 40 jaar geleden verlaten was meer zaden van korte-termijn persistente soorten bevatte dan de kalkgraslanden zelf. Dit verklaren ze door dormantie geïnduceerd door schaduw van de bomen. Hieruit concluderen de auteurs dat de zaadbank van voormalige kalkgraslanden waarop dennenbestanden staan een rol kan spelen in de restauratie van kalkgraslanden. Mogelijks waren er in onze studie dus ook nog zaden van specialistische soorten aanwezig in de zaadbank door dormantie opgelegd door slechte lichtcondities.

Een deel zaden was waarschijnlijk ook nog aanwezig in de zaadbank door een hoge zaadlevendheid, zonder dat deze in een toestand van dormantie waren. Het is echter niet duidelijk in welke mate zaden nog in de zaadbank zaten van de periode voor bebossing, en welke zaden opnieuw koloniseerden. Gegevens van enkele studies die de zaadbank van oude kalkgraslanden (dewelke al lange tijd begroeid waren met bomen of struiken) onderzochten, werden vergeleken met onze resultaten (Tabel 13). Hieruit bleek dat enkele specialistische soorten die in ons experiment werden aangetroffen in de zaadbank van gerestaureerde kalkgraslanden, ook voorkwamen in de bodem van dergelijke beboste graslanden. Afgaande op deze studies kunnen we met meer zekerheid aannemen dat deze

specialistische planten nog in de zaadbank zaten van de periode voor bebossing. Restauratie vanuit de zaadbank van beboste kalkgraslanden zal dus aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van kalkgraslanden die een tamelijk hoog aandeel typische kalkgraslandsoorten zullen bevatten. Net zoals Kalamees *et al.* (2012) kunnen we dus aannemen de zaadbank wel degelijk een belangrijke rol kan spelen bij het herstel van verlaten kalkgraslanden. Bijkomende maatregelen zullen echter nodig zijn om de exacte situatie van de oude kalkgraslanden terug te krijgen (zie verder).

Tabel 13: Enkele aangetroffen kalkgraslandspecialisten in de zaadbank van gerestaureerde kalkgraslanden in ons experiment. Kruisjes duiden op het feit dat een soort ook in een andere studie werd aangetroffen in de zaadbank van een verlaten kalkgrasland. A: Bisteau & Mahy (2005): coniferen bos (60 jaar) op oud grasland. B: Bossuyt *et al.* (2006): 40 tot 225 jaar geleden beboste en verboste oude kalkgraslanden. C: Kalamees *et al.* (2012): tot 50 jaar geleden verlaten oude kalkgraslanden, overgroeid door Hazelaar-Jenerverbes struweel. D: Kalamees & Zobel (1998): door bomen en struiken overgroeid oud kalkgrasland.

Soort	A	B	C	D
<i>Arabis hirsuta</i>			x	
<i>Carex flacca</i>				x
<i>Helianthemum nummularium</i>	x	x	x	
<i>Potentilla neumanniana</i>	x			
<i>Sedum acre</i>			x	
<i>Teucrium chamaedrys</i>	x			

Een ander deel van de specialistische soorten is waarschijnlijk via verspreiding in de ruimte terecht gekomen op de gerestaureerde graslanden. Zo bevestigde Fischer *et al.* (1996) de rol van schapen voor de verspreiding van zaden op kalkgraslanden. Ook Poschlod *et al.*, 1998 duiden op het feit dat schapen nodig zijn om de oorspronkelijke soortenrijkdom terug te krijgen op gerestaureerde kalkgraslanden. Wagner *et al.* (2012) toonde meer specifiek de stijging in het aandeel kalkgraslandspecialisten aan in fragmenten waar schapen werden gebruikt. De volgorde van begrazing van de kalkgraslanden zou goed doordacht moeten gebeuren. Tijdens periodes van zaadzet zou een groot deel van de schapen op oude graslanden geplaatst moeten worden. Wel moet hierbij gelet worden dat deze begrazing niet te intensief is, zodat zaden nog de kans krijgen om in de bodem terecht te komen. Nadat deze graslanden begraasd zijn, zouden de kuddes moeten verplaatst worden naar gerestaureerde graslanden. Dit zou het verbreidingsproces van specialistische soorten die op deze laatste nog niet voorkomen vergemakkelijken.

De automatische verbreiding van zaden (zoals bijvoorbeeld door anemochorie) vanuit oude kalkgraslanden heeft waarschijnlijk ook bijgedragen aan het voorkomen van specialistische soorten in de zaadbank van de gerestaureerde graslanden. Dit heeft echter hoogst waarschijnlijk enkel plaatsgevonden daar waar gerestaureerde kalkgraslanden grenzen aan

de oude. Fagan *et al.* (2008) vond immers dat het voorkomen van kalkgraslandsoorten op gerestaureerde graslanden zeer sterk geassocieerd was met de afstand tot oude kalkgraslanden. Ook Stampfli en Zeiter (1999) vonden dat vele kalkgraslandsoorten slechte verspreidingscapaciteiten hebben (verspreidingslimitatie). Fagan *et al.* (2009) raadt daarom aan om zaden van kalkgraslandspecialisten die niet voorkomen op gerestaureerde kalkgraslanden, maar wel in de bodem van de oude, manueel in te brengen. Dit zou een bijkomende, maar tijdsintensievere en duurdere optie kunnen zijn.

4.2.6 Algemene bemerkingen en beperkingen

De concentratiemethode van Ter Heerdt *et al.* (1996) bleek een efficiënte manier om een groot aantal zaailingen te bekomen in een relatief korte periode. Uit een studie van Price *et al.* (2010) op de zaadbank van moerassen blijkt wel dat er een groot verschil kan optreden in het gevonden aantal en de soorten zaden tussen de concentratiemethode en de methode waarbij men zaden zal determineren. Vele zaden met een diameter kleiner dan 0,2mm ontsnapten namelijk door de mazen van de zeef. Ook Traba *et al.* (1998) vond dat er veel zaden (maar geen soorten) verloren gingen bij de concentratiemethode bij zaadbankonderzoek van een mediterrane zaadbank. Een consultatie van de gegevens betreffende de zaadafmetingen van de planten op de kalkgraslanden uit de Viroin leerde ons echter dat hier amper planten zijn met zaadafmetingen kleiner dan 0,2 mm. Enkel sommige orchideeën hadden kleinere zaden, maar we verwachten niet dat deze zullen kiemen door hun specifieke vereisten. We verkiezen dus de concentratiemethode boven de zaaddeterminatiemethode. Deze laatste is bovendien zeer tijdsintensief en een goede kennis van de zaden is nodig (Price *et al.*, 2010).

Onderzoek van de zaadbank van beboste kalkgraslanden zou meer duidelijkheid opleveren betreffende de herkomst van de specialistische soorten op de gerestaureerde graslanden. Zo zou kunnen uitgemaakt worden welke soorten nog aanwezig zijn van voor de bebossing, hetzij in staat van dormantie of door de langlevendheid van de zaden (o.a. Bisteau & Mahy, 2005; Kalamees *et al.*, 2012).

Het uitvoeren van een warmtebehandeling, zoals eerder aangehaald, zou het aantal gekiemde zaden waarschijnlijk nog verhoogd hebben (zie Bossuyt & Honnay, 2008b). Eventueel zouden ook nog enkele typische kalkgraslandsoorten gevonden worden, zoals *Genista tinctoria* en *Teucrium botrys*. Door de tijdslimiet kon deze behandeling echter niet uitgevoerd worden.

4.2.7 Conclusie

Deze studie toont aan dat de restauratie van kalkgraslanden vanuit de zaadbank wel degelijk aanleiding kan geven tot het ontstaan van een soortenrijk kalkgrasland met typische graslandsoorten. Vele specialistische kalkgraslandsoorten werden immers aangetroffen in de zaadbank van gerestaureerde graslanden. Bijkomende verbreiding van zaden via onder andere schapen zal echter nodig zijn om ontbrekende typische kalkgraslandplanten terug te krijgen op de gerestaureerde fragmenten. Na de *assembly* van de zaadbank op gerestaureerde kalkgraslanden zal deze convergeren. Therofytische soorten, gekenmerkt door langlevende zaden (waarmee we een aantal plantenkenmerken hebben kunnen associëren) zullen verdwijnen uit de zaadbank (*disassembly*) doordat deze planten enkel recent na restauratie zullen voorkomen op de graslanden. Dit maakt ook dat de zaadbanksamenstelling van nieuwe graslanden onderling sterker verschilt dan deze van de oude graslanden. Therofyten zullen immers door toevalsgebeurtenissen met een verscheidene frequentie voorkomen op de verschillende gerestaureerde kalkgraslanden. Door deze vele ruderaal soorten op de gerestaureerde graslanden (dewelke van oorsprong niet thuishoren op kalkgraslanden) is hier ook geen 'isolatie-door-afstand' aanwezig. Op de oude graslanden verwachten we dit echter wel, door het hoger aandeel aan typische graslandsoorten. Door het grote aantal therofytische planten in zowel de vegetatie als in de zaadbank op gerestaureerde graslanden werd hier een verband tussen de vegetatie en de zaadbank gevonden. Door enerzijds convergentie van de zaadbank en anderzijds divergentie van de vegetatie met de tijd sinds restauratie verwachten we dit echter niet meer in oude graslanden. Het belang van het nemen van vele bodemstalen in een zaadbankonderzoek werd ook in deze studie bewezen door een zeer groot aantal teruggevonden soorten in de zaadbank.

5. Samenvatting

Kalkgraslanden zijn één van de soortenrijkste habitats ter wereld op kleine schaal. Door het stopzetten van het beheer en de aanplant van naaldboomplantages zijn deze biodiversiteitshotspots echter serieus in aandeel afgenomen. Vele restauratieprojecten focussen zich op het herstel van kalkgraslanden. Herstel vanuit de zaadbank is vaak een doeltreffende methode voor habitatherstel, maar betreffende deze habitats blijken de mogelijkheden echter beperkt.

Deze studie probeert om de kwaliteit na te gaan van de zaadbank van kalkgraslanden van een verscheidene ouderdom uit de Viroinvallei. In de zomer van 2012 werden bodemstalen genomen op zeven verscheidene kalkgraslanden (zowel op oude als gerestaureerde fragmenten), waarna deze stalen in een serre werden opgekweekt. Bijkomend werd een plantenkenmerken onderzoek uitgevoerd om na te gaan wat de relatie was tussen enkele plantenkenmerken en de langlevendheid van de zaden van de bestudeerde planten.

De therofytische levensvorm bleek sterk geassocieerd te zijn met langlevende zaden. Dit is gekoppeld aan enkele plantenkenmerken, zoals de zaadafmetingen. Soortenrijkdom en zaaddensiteit bleken hoger te zijn op de nieuwe kalkgraslanden in vergelijking met de oude. Nieuwe kalkgraslanden bleken een groter aandeel generalisten en therofyten te bevatten. In de zaadbank van deze gerestaureerde graslanden vindt namelijk een *assembly* van soorten plaats. Hierna zullen deze langzaam het proces van *disassembly* ondergaan door het verdwijnen van zaden van therofyten. De tijdsanalyse betreffende de gerestaureerde graslanden toonde geen *disassembly*. Indien de chronosequentie een langer tijdsinterval zou inhouden, en meer kalkgraslanden zouden bestudeerd worden, zou dit hoogst waarschijnlijk wel gevonden worden. Tijdens de *assembly* van gerestaureerde graslanden zullen ruderaal soorten door toeval in een andere frequentie voorkomen op de verscheidene graslanden. Hierdoor verschilt de zaadbanksamenstelling van nieuwe graslanden onderling sterker dan deze van de oude graslanden. Echter, een invloed van de afstand tussen de graslanden is ook mogelijk. Een isolatie-door-afstand werd niet waargenomen op de gerestaureerde graslanden. De therofytische soorten die hier nieuw op terecht komen hangen immers niet samen met de isolatie van de graslanden. Op de oude graslanden was echter wel een trend zichtbaar naar een isolatie-door-afstand doordat de typische graslandsoorten die hier voorkomen meer effecten ondervinden van isolatie. Doordat zich zowel vele therofyten in de vegetatie als in de zaadbank van de gerestaureerde graslanden bevinden, werd een significant verband tussen de vegetatie- en de zaadbank- soortensamenstelling aangetroffen. In de oude graslanden verwachten we dit verband echter niet meer door een divergentie van de vegetatie terwijl een convergentie van de zaadbank plaatsvindt.

Er werden vele specialistische soorten op de gerestaureerde graslanden aangetroffen. Mogelijk is een deel hiervan nog afkomstig van de oude graslanden die bebost werden. We kunnen stellen dat de zaadbank wel degelijk een belangrijke rol kan spelen bij het herstel van verlaten kalkgraslanden. Bijkomende maatregelen, zoals het gebruik van schapen zullen echter nodig zijn om de exacte situatie van op de oude kalkgraslanden terug te krijgen.

6. Summary

Calcareous grasslands are known as one of the most species-rich habitats in the world on a small scale. By stopping management and by the cultivation of conifer plantations, these biodiversity hotspots, however, seriously decreased in numbers. Many restoration projects focus on the restoration of calcareous grasslands. Recovery from the seed bank is often an effective method for habitat restoration, but concerning these habitats, the possibilities seem to be limited.

This study attempts to assess the quality of the seed bank of calcareous grasslands of different age from the valley of the Viroin. In the summer of 2012, soil samples were taken on seven different chalk grasslands (both on old and restored fragments), after which the samples were grown in a greenhouse. Additionally, a plant-trait research was conducted to check the relationship between some plant characteristics and the longevity of the seeds of the plants studied.

The therophytic life form seemed to be strongly associated with long-lived seeds. This is linked to some plant characteristics, such as seed size. Species richness and seed density were found to be higher on the new chalk grasslands compared with the old ones. Restored calcareous grasslands were found to contain a higher proportion of generalists and therophytes in the soil compared to old grasslands. In the seed banks of these restored grasslands, an assembly of species takes place. Hereafter, these undergo slowly the process of disassembly, due to the depletion of seeds of therophytes. The time analysis concerning the restored grasslands showed no disassembly. Most likely this would be found if the chrono sequence involved a longer time interval and more calcareous grasslands were studied. During the assembly of restored grasslands, ruderal species will by coincidence occur in another frequency on the different grasslands. Because of this, the seed bank composition of new grasslands varies stronger among themselves than old grasslands do. However, an effect of the distance between the grasslands is also possible. An isolation-by-distance was not observed in the restored grasslands. The new therophytic species that end up here aren't associated with the isolation of the grasslands after all. On the old grasslands however, there was a trend towards an isolation-by-distance, because of the typical grassland species which are more isolated. Because both in the vegetation and in the seed

bank of the restored grasslands a lot of therophytes occur, a significant relationship between vegetation and seed bank species composition was found. However, in the ancient grasslands we no longer expect this relationship because of a divergence of the vegetation, while a convergence of the seed bank occurs.

A lot of specialist species were found in the seed bank of the restored grasslands. Possibly, a part of these still comes from the ancient grasslands that were forested. We can say that the seed bank can indeed play an important role in the recovery of abandoned chalk grasslands. Additional actions, such as management by sheep, will be necessary to get the exact situation of the old limestone grasslands back.

7. Referenties

- Adriaens D., Honnay O. & Hermy M. (2006), No evidence of a plant extinction debt in highly fragmented calcareous grasslands in Belgium, *Biological conservation*, Vol. 133, pp. 212-224.
- Adriaens D. (2008), Spatio-temporal patterns of calcareous grassland fragmentation and consequences for plant species and communities, Proefschrift tot het behalen van de graad van Doctor in de Bio-ingenieurswetenschappen, K.U. Leuven, 208 p.
- Akinola M. O., Thompson K. & Buckland S. M. (1998), Soil seed bank of an upland calcareous grassland after 6 years of climate and management manipulations, *Journal of Applied Ecology*, Vol. 35, pp. 544-552.
- Aparicio A. & Guisande R. (1997), Replenishment of the endangered *Echinospartum albigicum* (*Genisteae, Fabaceae*) from the soil seed bank, *Biological Conservation*, Vol. 81, pp. 267-273.
- Baeten L., Hermy M., Van Daele S. & Verheyen K. (2010), Unexpected understorey community development after 30 years in ancient and post-agricultural forests, *Journal of Ecology*, Vol. 98, pp. 1447-1453.
- Bakker J.P., Poschlod P., Strykstra R.J., Bekker R.M. & Thompson K. (1996), Seed banks and seed dispersal: important topics in restoration ecology, *Acta Botanica Neerlandica*, Vol. 45, pp. 461-490.
- Baskin J.M. & Baskin C.C. (2004), A classification system for seed dormancy, *Seed Science Research*, Vol. 14, pp. 1-16.
- Bekker R.M., Bakker J.P., Grandin U., Kalamees R., Milberg P., Poschlod P., Thompson K. & Willems J.H. (1998), Seed size, shape and vertical distribution in the soil: indicators of seed longevity, *Functional Ecology*, Vol. 12, pp. 834-842.
- Bekker R.M., Bakker J.P., Ozinga W.A. & Thompson K. (2003), Seed traits: essential for understanding seed longevity, *Aspects of Applied Biology*, Vol. 69, pp. 1-9.
- Bisteau E. & Mahy G. (2005), A landscape approach for the study of calcareous grassland plant communities, *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, Vol. 9, pp. 93-99.
- Bobbink R. & Willems J.H. (1987), Increasing dominance of *Brachypodium pinnatum* (L.) Beauv. in chalk grasslands: a threat to a species-rich ecosystem, *Biological Conservation*, Vol. 40, pp. 301-314.
- Bobbink R. & Willems J.H. (1993), Restoration management of abandoned chalk grassland in the Netherlands, *Biodiversity and Conservation*, Vol. 2, pp. 616-626.

- Bossuyt B. & Hermy M. (2003), The potential of soil seedbanks in the ecological restoration of grassland and heathland communities, *Belgian Journal of Botany*, Vol. 136, pp. 23-34.
- Bossuyt B. & Hermy M. (2004), Seed bank assembly follows vegetation succession in dune slacks, *Journal of Vegetation Science*, Vol. 15, pp. 449-456.
- Bossuyt B. & Honnay O. (2008a), Can the seed bank be used for ecological restoration? An overview of seed bank characteristics in European communities, *Journal of Vegetation Science*, Vol. 19, pp. 875-884.
- Bossuyt B. & Honnay O. (2008b), Heat shock increases the reliability of a temperate calcareous grassland seed bank study, *Plant Ecology*, Vol. 199, pp. 1-7.
- Bossuyt B., Butaye J. & Honnay O. (2006), Seed bank composition of open and overgrown calcareous grassland soils - a case study from Southern Belgium, *Journal of Environmental Management*, Vol. 79, pp. 364-371.
- Butaye J., Honnay O., Adriaens D., Delescaillie L.M. & Hermy M. (2005), Phytosociology and phytogeography of the calcareous grasslands on Devonian limestone in Southwest Belgium, *Belgian Journal of Botany*, Vol. 138, pp. 24-38.
- Calaciura B. & Spinelli O. (2008), Management of Natura 2000 habitats. 6210 Semi-natural dry grasslands and scrubland facies on calcareous substrates (*Festuco-Brometalia*), European Commission, 42 p.
- Chapin, F.S. III, Walker B.H., Hobbs R.J., Hooper D.U., Lawton J.H., Sala O.E. & Tilman D. (1997), Biotic Control over the Functioning of Ecosystems, *Science*, Vol. 277, pp. 500-504.
- Charlesworth D. & Willis J.H. (2009), The genetics of inbreeding depression, *Nature Reviews Genetics*, Vol. 10, pp. 783-796.
- Chase J.M., Kraft N.J.B., Smith K.G., Vellend M. & Inouye B.D. (2011), Using null models to disentangle variation in community dissimilarity from variation in α -diversity, *Ecosphere*, Vol. 2, 11 p.
- Christoffoleti P.J. & Caetano R.S.X. (1998), Soil seed banks, *Scientia Agricola*, Vol. 55, pp. 74-78.
- Connor E.F. & McCoy E.D. (2001), Species-area relationships, *Encyclopedia of Biodiversity*, Vol. 5, pp. 397-411.
- Cornelissen J.H.C. (1999), A triangular relationship between leaf size and seed size among woody species: allometry, ontogeny, ecology and taxonomy, *Oecologia*, Vol. 118, pp. 248-255.

- Courchamp F., Berec L. & Gascoigne J. (2008), Allee effects in ecology and conservation, Oxford University Press, New York, 272 p.
- Cousins S.A.O. (2009), Extinction debt in fragmented grasslands: paid or not?, *Journal of Vegetation Science*, Vol. 20, pp. 3-7.
- Davies A. & Waite S. (1998), The persistence of calcareous grassland species in the soil seed bank under developing and established scrub, *Plant Ecology*, Vol. 136, pp. 27-39.
- Decler K. (2007), Europees beschermde natuur in Vlaanderen en het Belgische deel van de Noordzee, habitattypen I dier- en plantensoorten, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, 584 p.
- Delvingt W. (2006), Haute Meuse 30/8/2006 - Restoration and sustainable management of upper Meuse dry Grasslands, 6 p.
- Diaz S. & Cabido M. (1997), Plant functional types and ecosystem function in relation to global change, *Journal of Vegetation Science*, Vol. 8, pp. 463-474.
- Eggelte H. (2007), Veldgids Nederlandse Flora, vijfde editie, Knnv Uitgeverij, 472 p.
- Ellenberg H.H. (1988), Vegetation ecology of Central Europe, Cambridge University Press, 731 p.
- Ellenberg H., Düll R., Wirth V., Werner W. & Paulissen D. (1992), Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa, *Scripta Geobotanica*, Vol. 18, pp. 1-248.
- Ellstrand N.C. & Elam D.R. (1993), Population genetic consequences of small population size: Implications for Plant Conservation, *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 24, pp. 217-242.
- Fagan K.C., Pywell R.F., Bullock J.M. & Marrs R.H. (2009), The seed banks of English lowland calcareous grasslands along a restoration chronosequence, *Plant Ecology*, Vol. 208 pp. 199-211.
- Fagan K.C., Pywell R.F., Bullock J.M. & Marrs R.H. (2008), Do restored calcareous grasslands on former arable fields resemble ancient targets? The effect of time, methods and environment on outcomes, *Journal of Applied Ecology*, Vol. 45, pp. 1293-1303.
- Finch-Savage W.E. & Leubner-Metzger G. (2006), Seed dormancy and the control of germination, *New Phytologist*, Vol. 171, pp. 501-523.
- Fischer S.F., Poschlod P. & Beinlich B. (1996), Experimental studies on the dispersal of plants and animals on sheep in calcareous grasslands, *Journal of Applied Ecology*, Vol. 33, pp. 1206-1222.

- Fukami T., Bezemer M.T., Mortimer S.R. & Putten W.H. (2005), Species divergence and trait convergence in experimental plant community assembly, *Ecology Letters*, Vol. 8, pp. 1283-1290.
- Giles B.E. & Goudet J. (1997), Genetic differentiation in *Silene dioica* metapopulations: estimation of spatiotemporal effects in a successional plant species, *The American Naturalist*, Vol. 149, pp. 507-526.
- Gonzalez A. (2000), Community relaxation in fragmented landscapes: the relation between species richness, area and age, *Ecology Letters*, Vol. 3, pp. 441-448.
- Goossens D. (1984), Inleiding tot de geologie en geomorfologie van België, Uitgeverij van den Berg, Enschede, 228 p.
- Grime J.P. (1977), Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory, *The American Naturalist*, Vol. 111, pp. 1169-1194.
- Hammer Ø., Harper D.A.T. & Ryan P.D. (2001), PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis, 9 p.
- Hanski I. & Ovaskainen O. (2002), Extinction debt at extinction threshold, *Conservation Biology*, Vol. 16, pp. 666-673.
- Helsen K., Hermy M. & Honnay O. (2012), Trait but not species convergence during plant community assembly in restored semi-natural grasslands, *Oikos*, Vol. 121, pp. 2121-2130.
- Helsen K., Hermy M. & Honnay O. (2013), Spatial isolation slows down directional plant functional group assembly in restored semi-natural grasslands, *Journal of Applied Ecology*, Vol. 50, pp. 404-413.
- Helm A., Oja T., Saar L., Takkis K., Talve T. & Pärtel M. (2009), Human influence lowers plant genetic diversity in communities with extinction debt, *Journal of Ecology*, Vol. 97, pp. 1329-1336.
- Hermy M., De Blust G. & Slootmaekers M. (2004), Natuurbeheer, Uitgeverij Davidsfonds in samenwerking met Argus vzw, Natuurpunt vzw en het IN, Leuven, 452 p.
- Honnay O., Bossuyt B., Jacquemyn H., Shimono A. & Uchiyama K. (2008), Can a seed bank maintain the genetic variation in the above ground plant population?, *Oikos*, Vol. 117, pp. 1-5.
- Honnay O., Butaye J., Adriaens D. & De Hert K. (2004), De kalkgraslanden van de Viroinvalllei: Plantengemeenschappen en de invloed van beheer en habitatversnippering, *Natuur.focus*, Vol. 3, pp. 135-141.

- Honnay O., Adriaens D., Coart E., Jacquemyn H. & Roldan-Ruiz I. (2007), Genetic diversity within and between remnant populations of the endangered calcareous grassland plant *Globularia bisnagarica* L., *Conservation Genetics*, Vol. 8, pp. 293-303.
- Honnay O., Coart E., Butaye J., Adriaens D., Van Glabeke S. & Roldan-Ruiz I. (2006), Low impact of present and historical landscape configuration on the genetics of fragmented *Anthyllis vulneraria* populations, *Biological Conservation*, Vol. 127, pp. 411-419.
- Honnay O., Endels P., Vereecken H. & Hermy M. (1999), The role of patch area and habitat diversity in explaining native plant species richness in disturbed suburban forest patches in northern Belgium, *Diversity and Distributions*, Vol. 5, pp. 129-141.
- Hopfensperger K.N. (2007), A review of similarity between seed bank and standing vegetation across ecosystems, *Oikos*, Vol. 116, pp. 1438-1448.
- Jacquemyn H., Brys R. & Hermy M. (2003), Short-term effects of different management regimes on the response of calcareous grassland vegetation to increased nitrogen, *Biological Conservation*, Vol. 111, pp. 137-147.
- Jacquemyn H., Van Mechelen C., Brys R. & Honnay O. (2011), Management effects on the vegetation and soil seed bank of calcareous grasslands: an 11-year experiment, *Biological Conservation*, Vol. 144, pp. 416-422.
- Jakobsson A. & Eriksson O. (2000), A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants, *Oikos*, Vol. 88, pp. 494-502.
- Jutila H.M. & Grace J.B. (2002), Effects of disturbance on germination and seedling establishment in a coastal prairie grassland: A test of the competitive release hypothesis, *Journal of Ecology*, Vol. 90, pp. 291-302.
- Kahmen S., Poschlod P. & Schreiber K.F. (2002), Conservation management of calcareous grasslands. Changes in plant species composition and response of functional traits during 25 years, *Biological Conservation*, Vol. 104, pp. 319-328.
- Kalamees R., Püssa K., Zobel K. & Zobel M. (2012), Restoration potential of the persistent soil seed bank in successional calcareous (alvar) grasslands in Estonia, *Applied Vegetation Science*, Vol. 15, pp. 208-218.
- Kalamees R. & Zobel M. (1997), The seed bank in an Estonian calcareous grassland: comparison of different successional stages, *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, Vol. 32, pp. 1-14.
- Kalamees R. & Zobel M. (1998), Soil seed bank composition in different successional stages of a species rich wooded meadow in Laelatu, western Estonia, *Acta Oecologica*, Vol. 19, pp. 175-180.

- Kalamees R. & Zobel M. (2002), The role of the seed bank in gap regeneration in a calcareous grassland community, *Ecology*, Vol. 83, pp. 1017-1025.
- Kleyer M., Bekker R.M., Knevel I.C., Bakker J.P., Thompson K., Sonnenschein M., Poschlod P., van Groenendael J.M., Klimes L., Klimesova J. *et al.* (2008), The LEDA Traitbase: a database of life-history traits of the Northwest European flora, *Journal of Ecology*, Vol. 96, pp. 1266-1274.
- Klotz S., Kühn I. & Durka W. (2002), BIOLFLOR - Eine Datenbank zu biologisch-ökologischen Merkmalen der Gefäßpflanzen in Deutschland, *Schriftenreihe für Vegetationskunde*, Vol. 38, Bonn: Bundesamt für Naturschutz.
- Kuiters A.T. & Huiskes H.P.J. (2010), Potential of endozoochorous seed dispersal by sheep in calcareous grasslands: correlations with seed traits, *Applied Vegetation Science*, Vol. 13, pp. 163-172.
- Kull K. & Zobel M. (1991), High species richness in an Estuonian wooded meadow, *Journal of Vegetation Science*, Vol. 2, pp. 715-718.
- Lambinon J., De Langhe J.E., Delvosalle L. & Duvigneaud, J. (1998), Flora van België, het Groothertogdom Luxemburg, noord-Frankrijk en de aangrenzende gebieden (Pteridofyten en Spermofyten), derde editie, Nationale plantentuin van België: Meise, 1092 p.
- Lande R. (1988), Genetics and demography in biological conservation, *Science*, Vol. 241, pp. 1455-1460.
- Lavorel S. & Garnier E. (2002), Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail, *Functional Ecology*, Vol. 16, pp. 545-556.
- Leishman M.R., Westoby M. & Jurado E. (1995), Correlates of seed size variation: a comparison among five temperate floras, *Journal of Ecology*, Vol. 83, pp. 517-530.
- Lomolino M.V. (2001), Ecology's most general, yet protean pattern: the species-area relationship, *Journal of Biogeography*, Vol. 27, pp. 17-26.
- Milberg P. (1993), Soil seed banks and germination ecology in Swedish semi-natural grasslands, SLU /Repro, Uppsala, 94 p.
- Milberg P. & Hansson M.L. (1993), Soil seed bank and species turnover in a limestone grassland, *Journal of Vegetation Science*, Vol. 4, pp. 35-42.
- Pakeman R.J., Digneffe G. & Small J.L. (2002), Ecological correlates of endozoochory by herbivores, *Functional Ecology*, Vol. 16, pp. 296-304.
- PC-ORD6, MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A.

- Piessens K., Honnay O., Palmaerts W. & Hermy M. (2005), Veranderingen in het heide-areaal in het noorden van West-Vlaanderen: gevolgen voor de plantendiversiteit, *Natuur.focus*, Vol. 4, pp. 9-15.
- Piqueray J., Bottin G., Delescaille L.M., Bisteau E., Colinet G. & Mahy G. (2011), Rapid restoration of a species-rich ecosystem assessed from soil and vegetation indicators: The case of calcareous grasslands restored from forest stands, *Ecological Indicators*, Vol. 11, pp. 724-733.
- Plue J., Goyens G., Van Meirvenne M., Verheyen K. & Hermy M. (2010a), Small-scale seed-bank patterns in a forest soil, *Seed Science Research*, Vol. 20, pp. 13-22.
- Plue J., Van Gils B., Peppler-Lisbach C., De Schrijver A., Verheyen K. & Hermy M. (2010b), Seed-bank convergence under different tree species during forest development, *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, Vol. 12, pp. 211-218.
- Poland J. & Clement E. (2009), *The vegetative key to the British flora*, gepubliceerd door John Poland, 556 p.
- Poschlod P., Kiefer S., Tränkle U., Fischer S. & Bonn S. (1998), Plant species richness in calcareous grasslands, *Applied Vegetation Science*, Vol. 1, pp. 75-91.
- Poschlod P. & WallisDeVries M.F. (2002), The historical and socioeconomic perspective of calcareous grasslands - lessons from the distant and recent past, *Biological Conservation*, Vol. 104, pp. 361-376.
- Price J.N., Wright B.R., Gross C.L. & Whalley W.R.D.B. (2010), Comparison of seedling emergence and seed extraction techniques for estimating the composition of soil seed banks, *Methods in Ecology & Evolution*, Vol. 1, pp. 151-157.
- Raunkiaer C. (1937), *Plant life forms*, Oxford University Press, 104 p.
- Römermann C., Tackenberg O. & Poschlod P. (2005), How to predict attachment potential of seeds to sheep and cattle coat from simple morphological seed traits, *Oikos*, Vol. 110, pp. 219-230.
- Royo A.A. & Ristau T.E. (2012), Stochastic and deterministic processes regulate spatio-temporal variation in seed bank diversity, *Journal of Vegetation Science*, niet gepubliceerd.
- Silva J.P., Toland J., Jones W., Eldridge J., Thorpe E. & O'Hara E. (2008), LIFE and Europe's grasslands: Restoring a forgotten habitat, *LIFE Focus*, 56 p.
- Stampfli A. & Zeiter M. (1999), Plant species decline due to abandonment of meadows cannot easily be reversed by mowing. A case study from the southern Alps, *Journal of Vegetation Science*, Vol. 10, pp. 151-164.

- Statistica 10, Statsoft Inc, (1995), STATISTICA for Windows (Computer Program Manual), Tulsa, OK.
- Templeton A.R. & Levin D.A. (1979), Evolutionary consequences of seed pools, *The American Naturalist*, Vol. 14, pp. 232-237.
- Ter Heerdt G.N.J., Verweij G.L., Bekker R.M. & Bakker J.P. (1996), An improved method for seedbank analysis: seedling emergence after removing the soil by sieving, *Functional ecology*, Vol. 10, pp. 144-151.
- Thompson K., Band S.R. & Hodgson J.G. (1993), Seed size and shape predict persistence in soil, *Functional Ecology*, Vol. 7, pp. 236-241.
- Thompson K., Bakker J. & Bekker R.M. (1997), The soil seed bank of North West Europe: methodology, density and longevity, *Cambridge University Press*, 275 p.
- Thompson K., Bakker J.D., Bekker R.M., Hodgson J.G. (1998), Ecological correlates of seed persistence in soil in the north-west European flora, *Journal of Ecology*, Vol. 86, pp. 163-169.
- Thompson K. & Grime J.P. (1979), Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats, *Journal of Ecology*, Vol. 67, pp. 893-921.
- Tilman D., May R.M., Lehman C.L. & Nowak M.A. (1994), Habitat destruction and the extinction debt, *Nature*, Vol. 371, pp. 65-66.
- Traba J., Levassor C. & Peco B. (1998), Concentrating samples can lead to seed losses in soil bank estimations, *Functional Ecology*, Vol. 12, pp. 975-976.
- Uesugi R., Nishihiro J., Tsumura Y. & Washitani I. (2007), Restoration of genetic diversity from soil seed banks in a threatened aquatic plant, *Nymphoides peltata*, *Conservation Genetics*, Vol. 8, pp. 111-121.
- Van Beek E., Bossuyt B., Couvreur M., Roovers P. & Hermy M. (2004), Praktische werkwijze: zaadbankanalyse - kiemingsexperiment, 3 p.
- Van den Berg L.J.L., Vergeer P., Rich T.C.G., Smart S.M., Guest D. & Ashmore M.R. (2010), Direct and indirect effects of nitrogen deposition on species composition change in calcareous grasslands, *Global Change Biology*, Vol. 17, pp. 1871-1883.
- Van Katwijk M.M. & Ter Braak C.J.F. (2008), Handleiding voor het gebruik van multivariate analysetechnieken in de ecologie, *Ecoscience*, Universiteit Nijmegen, 36 p.
- Van Landuyt W., Hoste I., Vanhecke L., Van den Bremt P., Vercruyssen E. & De Beer D. (2006), Atlas van de flora van Vlaanderen en het Brussels Gewest, Brussel, Instituut voor natuur- en bosonderzoek, Nationale Plantentuin van België en Flo.Wer, 1007 p.

- Van Swaay C.A.M. (2002), The importance of calcareous grasslands for butterflies in Europe, *Biological Conservation*, Vol. 104, pp. 315-318.
- Violle C., Navas M.L., Vile D., Kazakou E., Fortunel C., Hummel I. & Garnier E. (2007), Let the concept of trait be functional!, *Oikos*, Vol. 116, pp. 882-892.
- Vleeshouwers L.M., Bouwmeester H.J. & Karssen C.M. (1995), Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology, *Journal of Ecology*, Vol. 83, pp. 1031-1037.
- Wagner M., Poschlod P. & Setchfield R.P. (2003), Soil seed bank in managed and abandoned semi-natural meadows in Soomaa National Park, Estonia, *Annales Botanici Fennici*, Vol. 40, pp. 87-100.
- Wagner H.H., Rico Y., Lehnert H. & Boehmer H.J. (2012), Process-based long-term evaluation of an ecological network of calcareous grasslands connected by sheep herding, *Ecography*, Vol. 35, pp. 1-9.
- WallisDeVries M.F., Poschlod P. & Willems J.H. (2002), Challenges for the conservation of calcareous grasslands in northwestern Europe: integrating the requirements of flora and fauna, *Biological Conservation*, Vol. 104, pp. 265-273.
- Westoby M. (1998), A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme, *Plant and Soil*, Vol. 199, pp. 213-227.
- Willems J.H. (1983), Species composition and above-ground biomass in chalkgrassland with different management, *Vegetatio*, Vol. 52, pp. 171-180.
- Willems J.H. & Bik L.P.M. (1998), Restoration of high species density in calcareous grassland: the role of seed rain and soil seed bank, *Applied Vegetation Science*, Vol. 1, pp. 91-100.
- Wilson J.B., Peet R.K., Dengler J. & Pärtel M. (2012), Plant species richness: the world records, *Journal of Vegetation Science*, Vol. 23, pp. 796-802.
- Wright S. (1943), Isolation by distance, *Genetics*, Vol. 28, pp. 114-138.
- Young A., Boyle T. & Brown T. (1996), The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants, *Trends in Ecology & Evolution*, Vol. 11, pp. 413-418.
- W1: Website Vegetation Science Group, Vegetation of the Czech Republic, Geraadpleegd op 10 januari 2013, <http://www.sci.muni.cz/botany/vegsci/vegetace.php?lang=en&typ=THF>.
- W2: Website Agentschap voor natuur en bos (ANB), Habitatrichtlijn, Geraadpleegd op 17 december 2012, [http://www.natuurenbos.be/nl-BE/Wetgeving en Subsidies/Wetgeving/Soortenbescherming/Internationaal/Habitatrichtlijn.aspx](http://www.natuurenbos.be/nl-BE/Wetgeving%20en%20Subsidies/Wetgeving/Soortenbescherming/Internationaal/Habitatrichtlijn.aspx).

W3: Website Europa, Natuurlijke habitats (Natura 2000), Geraadpleegd op 17 december 2012,

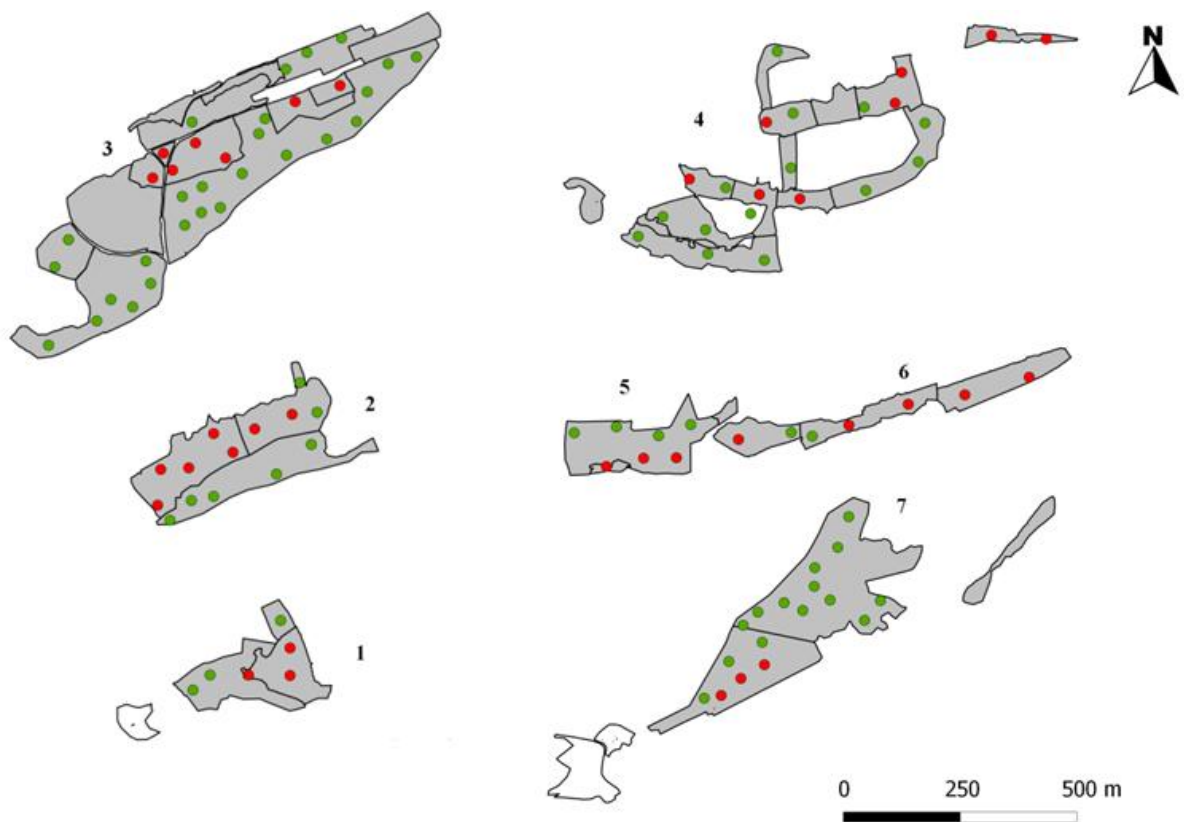
http://europa.eu/legislation_summaries/environment/nature_and_biodiversity/l28076_nl.htm.

W4: Website LIFE, LIFE Programme, Geraadpleegd op 20 oktober 2012, <http://ec.europa.eu/environment/life/index.htm>.

W5: Website LIFE Héliantheme, Het project LIFE Héliantheme, Geraadpleegd op 23 december 2012, <http://www.life-heliantheme.eu/index.php?id=1367&L=3>.

Zavaleta E., Pasari J., Moore J., Hernandez D., Suttle K.B. & Wilmers C.C. (2009), Ecosystem responses to community disassembly, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1162, p. 311-333.

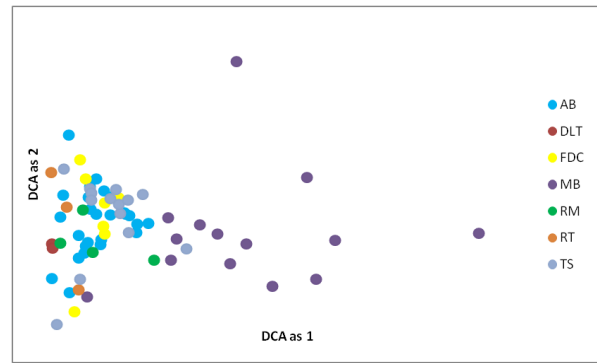
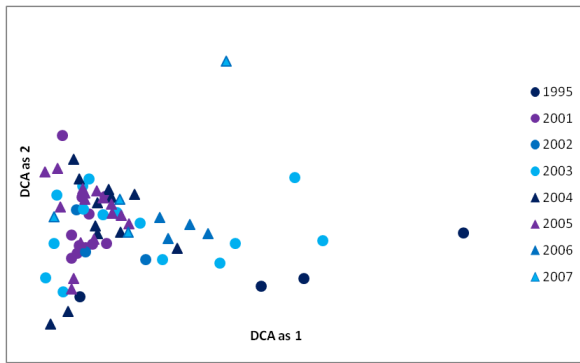
8. Appendix



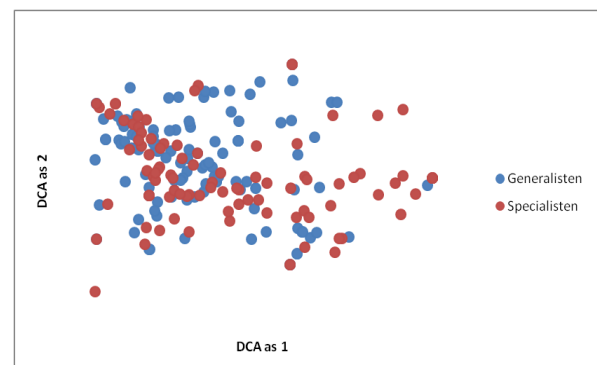
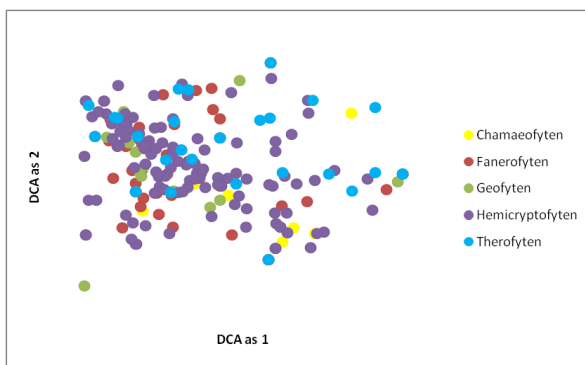
Appendix 1: Detailoverzicht van de onderzochte kalkgraslanden (zie ook ondertitel 2.2). Groene bolletjes stellen de kwadranten voor die bemonsterd werden op de nieuwe graslandfragmenten. De rode bolletjes stellen de kwadranten voor die bemonsterd werden op de oude graslandfragmenten. (1: Roche Trouée, 2: Fondry des Chiens, 3: Les Abannets, 4: Montagne aux Buis, 5: Roche Madoux, 6: Dessous le Transoi, 7: Tienne de Saumières.

Appendix 2: Verband van plantenkenmerken met levensduur van het zaad. De gebruikte testen, bekomen teststatistieken, R^2 waarden en p-waarden voor elk van de variabelen zijn weergegeven. * : Variabelen waarbij de afhankelijke variabele (levensduur van het zaad) log+1 getransformeerd werd om aan de assumpties te voldoen. \diamond : Variabelen waarbij de covariaten log+1 werden getransformeerd om *outliers* weg te werken. Significante waarden zijn in het vetgedrukt en cursief weergegeven.

Variabele	Test	Test stat	R^2	P
Ellenberg L	Spearman	<i>t = 2,06</i>	<i>0,013</i>	<i>0,041</i>
Ellenberg R	Spearman	t = -1,63	0,011	0,11
Ellenberg T	Spearman	t = 1,2	0,0069	0,23
Ellenberg K	Spearman	t = -0,7	0,0019	0,47
Ellenberg F	Spearman	t = 1,5	0,0082	0,13
Ellenberg N	Spearman	<i>t = 2,2</i>	<i>0,017</i>	<i>0,028</i>
Zaadgewicht \diamond	Pearson	<i>t = -7,7</i>	<i>0,017</i>	<i><0,0010</i>
Zaadlengte \diamond	Pearson	<i>t = -6,9</i>	<i>0,13</i>	<i><0,0010</i>
Zaadbreedte \diamond	Pearson	<i>t = -5,9</i>	<i>0,11</i>	<i><0,0010</i>
Zaadvorm	Spearman	t = -0,7	0,0018	0,49
Planthoogte* \diamond	Pearson	<i>t = -5,5</i>	<i>0,087</i>	<i><0,0010</i>
Log zadenaantal*	Pearson	<i>t = 3,1</i>	<i>0,031</i>	<i>0,0019</i>
Bladoppervlakte \diamond	Spearman	<i>t = -2,5</i>	<i>0,022</i>	<i>0,012</i>
Start bloei	Spearman	t = 1,8	0,011	0,059



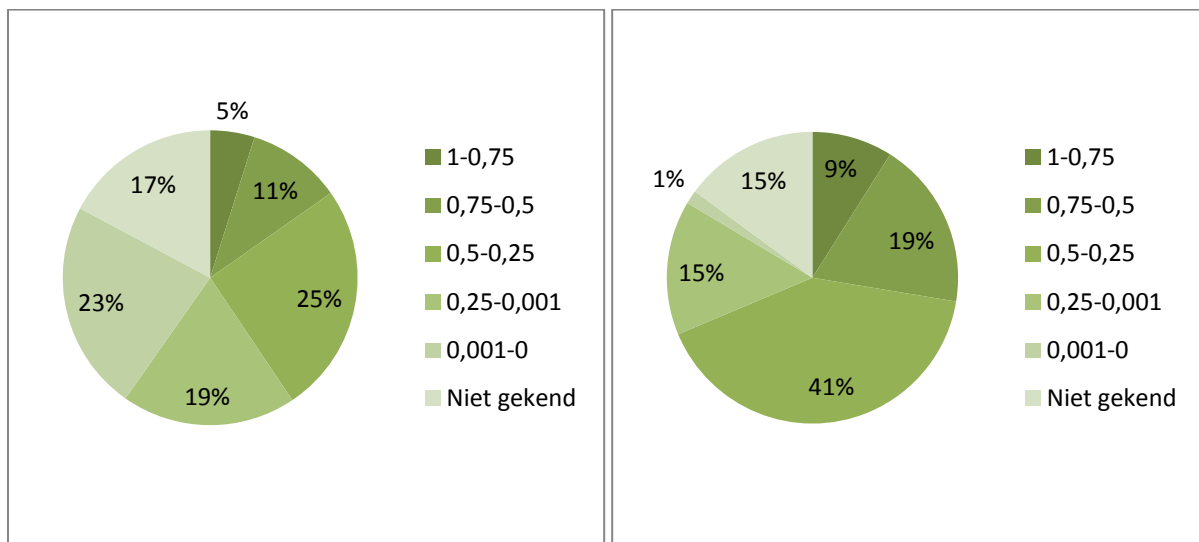
Appendix 3: DCA plotordinatie van de vegetatiegegevens. De linkse grafiek deelt de opnameplots in volgens de leeftijd van de kalkgraslanden, de rechtse grafiek categoriseert de opnameplots volgens kalkgrasland waarop deze genomen zijn. De eigenwaarden van DCA as 1 en DCA as 2 zijn respectievelijk 0,64 en 0,34.



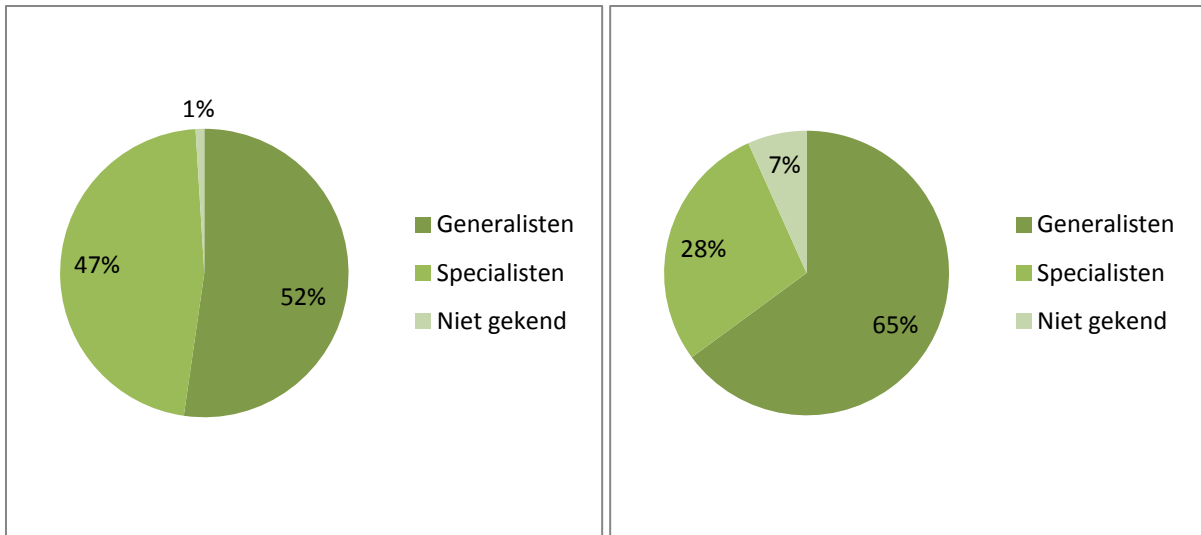
Appendix 4: DCA soortenordinatie van de vegetatiegegevens. De linkse grafiek deelt de soorten in volgens de levensvormen van Raunkiaer, de rechtse grafiek categoriseert de soorten volgens hun specialisatie. De eigenwaarden van DCA as 1 en DCA as 2 zijn respectievelijk 0,64 en 0,34.

Appendix 5: Post hoc resultaten van de Friedman ANOVA, gecorrigeerd met de Bonferroni-correctie. De χ^2 waarden zijn telkens weergegeven. H: hemicryptofyten, T: therofyten, F: fanerofyten, G: geofyten & C: chamaeofyten. 'Soorten' vergelijkt telkens het aantal soorten van de betreffende levensvorm tussen de andere levensvormen. 'Zaaddensiteit' vergelijkt telken de zaaddensiteit van de betreffende levensvorm met de andere levensvormen. Significante p waarden waren telkens <0,0010.

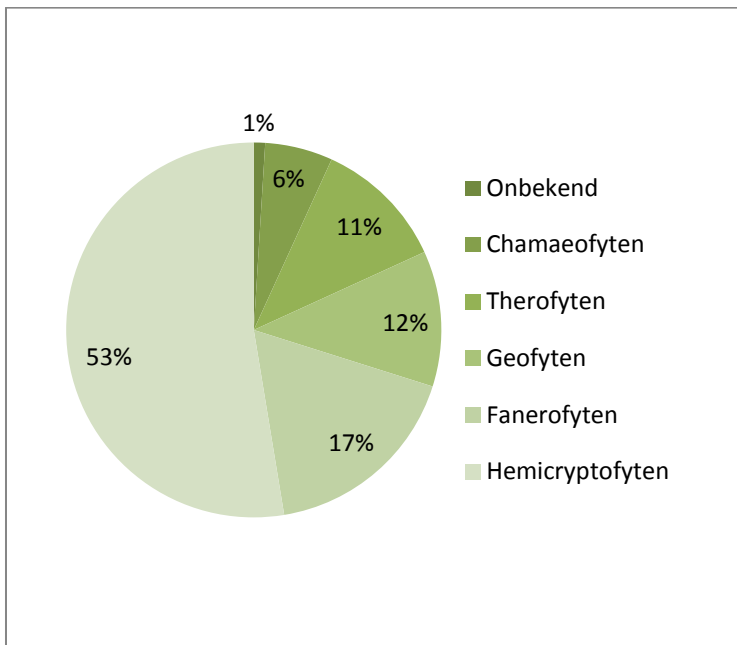
	Hemicryptofyten	Therofyten	Fanerofyten	Geofyten	Chamaeofyten
H soorten	/	101,0	105,0	105,0	106,0
T soorten	101,0	/	24,2	40,1	50,2
F soorten	105,0	24,2	/	0,7	2,1
G soorten	105,0	40,1	0,7	/	3,1
C soorten	106,0	50,2	2,1	3,1	/
H zaaddensiteit	/	87,6	101,0	100,0	98,2
T zaaddensiteit	87,6	/	20,3	27,0	41,8
F zaaddensiteit	101,0	20,3	/	0,06	2,6
G zaaddensiteit	100,0	27,0	0,06	/	5,7
C zaaddensiteit	98,2	41,8	2,6	5,7	/



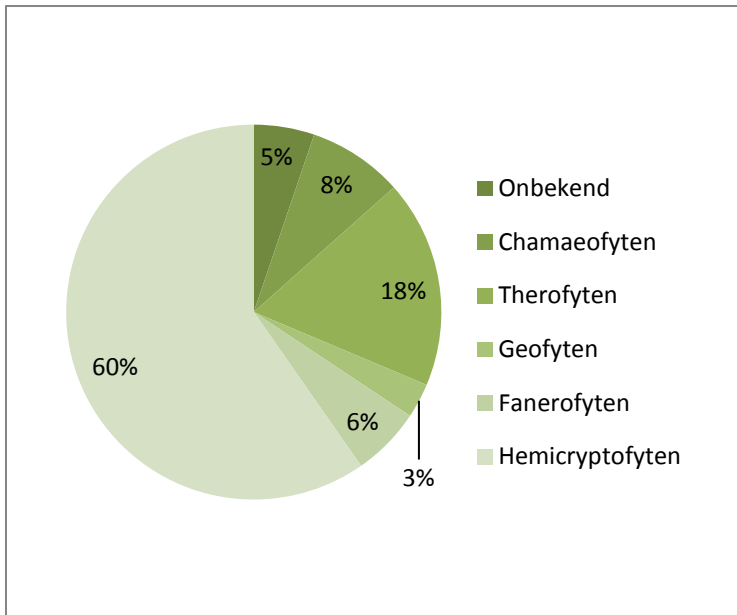
Appendix 6: Links: Taartdiagram van de langlevendheid van de zaden van alle plantensoorten die geobserveerd werden op de onderzochte kalkgraslanden. In totaal werden 308 plantensoorten genoteerd. Rechts: Taartdiagram van de langlevendheid van de zaden van de geobserveerde plantensoorten in ons experiment (134 plantensoorten in het totaal).



Appendix 7: Links: Taartdiagram van de specialisatie van de zaden van alle plantensoorten die geobserveerd werden op de onderzochte kalkgraslanden. In totaal werden 308 plantensoorten genoteerd. Rechts: Taartdiagram van de specialisatie van de zaden van de geobserveerde plantensoorten in ons experiment (134 plantensoorten in het totaal).



Appendix 8: Taartdiagram van de verdeling van de levensvormen van Raunkiaer betreffende alle soorten die voorkomen op de onderzochte kalkgraslanden. In totaal komen 308 plantensoorten voor op de desbetreffende kalkgraslanden.



Appendix 9: Taartdiagram van de verdeling van de verscheidene levensvormen van Raunkiaer betreffende de geobserveerde soorten in ons zaadbankexperiment. Het totaal aantal soorten is 134.

Appendix 10: Overzicht van de aangetroffen soorten in het zaadbankexperiment met hun type van specialisatie (s: specialist, g: generalist van kalkgraslanden) en de indeling volgens de levensvormen van Raunkiaer.

SOORT	SOORT	s/g	levensvorm
<i>Achillea millefolium</i>	Duizendblad	g	hemicryptofyt
<i>Acinos arvensis</i>	Kleine steentijm	s	hemicryptofyt
<i>Acinos</i> sp.	Steentijm sp.	s	hemicryptofyt
<i>Agrostis capillaris</i>	Gewoon struisgras	g	hemicryptofyt
<i>Agrostis stolonifera</i>	Fioringras	g	hemicryptofyt
<i>Anagallis arvensis</i>	Rood guichelheil	g	therofyt
<i>Aphanes arvensis</i>	Grote leeuwenklauw	g	therofyt
<i>Arabis hirsuta</i>	Ruige scheefkelk	s	hemicryptofyt
<i>Arenaria serpyllifolia</i>	Gewone zandmuur	s	therofyt
<i>Atropa belladonna</i>	Wolfskers	s	hemicryptofyt
<i>Barbarea stricta</i>	Stijf barbarakruid	g	hemicryptofyt
<i>Betula pendula</i>	Ruwe berk	g	fanerofyt
<i>Brachypodium pinnatum</i>	Gevinde kortsteel	s	hemicryptofyt
<i>Calluna vulgaris</i>	Struikheide	g	therofyt
<i>Campanula rotundifolia</i>	Grasklokje	g	hemicryptofyt
<i>Cardamine hirsuta</i>	Kleine veldkers	g	therofyt
<i>Carduus crispus</i>	Kruldistel	g	hemicryptofyt
<i>Carex flacca</i>	Zeegroene zegge	s	geofyt
<i>Carex</i> sp.	Zegge sp.	s	/
<i>Centaurea jacea</i>	Knoopkruid	g	hemicryptofyt
<i>Centaurium erythraea</i>	Echt duizendguldenkruid	g	hemicryptofyt
<i>Cerastium fontanum</i>	Gewone hoornbloem	g	chamaeofyt
<i>Cerastium pumilum</i>	Steenhoornbloem	s	therofyt
<i>Chaenorhinum minus</i>	Kleine leeuwenbek	g	therofyt
<i>Chenopodium polyspermum</i>	Korrelganzevoet	g	therofyt
<i>Cirsium arvense</i>	Akkerdistel	g	geofyt
<i>Cirsium palustre</i>	Kale jonker	g	hemicryptofyt
<i>Cirsium vulgare</i>	Speerdistel	g	hemicryptofyt
<i>Conyza canadensis</i>	Canadese fijnstraal	g	hemicryptofyt
<i>Dactylis glomerata</i>	Kropaar	g	hemicryptofyt
<i>Danthonia decumbens</i>	Tandjesgras	g	hemicryptofyt
<i>Daucus carota</i>	Wilde peen	g	hemicryptofyt
<i>Echium vulgare</i>	Slangenkruid	s	hemicryptofyt
<i>Epilobium ciliatum</i>	Bekliede basterdwederik	g	hemicryptofyt
<i>Epilobium hirsutum</i>	Harig wilgenroosje	g	hemicryptofyt
<i>Epilobium montanum</i>	Bergbasterdwederik	g	hemicryptofyt
<i>Epilobium</i> sp.	Basterdwederik sp.	g	hemicryptofyt
<i>Epilobium tetragonum</i>	Kantige basterdwederik	g	hemicryptofyt
<i>Erica tetralix</i>	Dopheide	g	chamaeofyt
<i>Eupatorium cannabinum</i>	Koninginnekruid	g	hemicryptofyt
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Kroontjeskruid	g	hemicryptofyt
<i>Fallopia convolvulus</i>	Zwaluwtong	g	therofyt
<i>Festuca lemanii</i>	Groot schapengras	s	hemicryptofyt

<i>Fragaria vesca</i>	Bosaardbei	g	hemicryptofyt
<i>Fumaria officinalis</i>	Gewone duivenkervel	g	therofyt
<i>Galium aparine</i>	Kleefkruid	g	therofyt
<i>Galium pumilum</i>	Kalkwalstro	s	hemicryptofyt
<i>Galium saxatile</i>	Liggend walstro	g	chamaeofyt
<i>Galium verum</i>	Geel walstro	s	hemicryptofyt
<i>Genista sagittalis</i>	Pijlbrem	s	fanerofyt
<i>Geranium columbinum</i>	Fijne ooievaarsbek	s	hemicryptofyt
<i>Geranium robertianum</i>	Robertskruid	g	hemicryptofyt
<i>Geum urbanum</i>	Geel nagelkruid	g	hemicryptofyt
<i>Globularia punctata</i>	Kogelbloem	s	chamaeofyt
<i>Helianthemum nummularium</i>	Geel zonneroosje	s	fanerofyt
<i>Hieracium pilosella</i>	Muizenoor	g	hemicryptofyt
<i>Holcus lanatus</i>	Gestreepte witbol	g	hemicryptofyt
<i>Hypericum hirsutum</i>	Ruig hertshooi	s	hemicryptofyt
<i>Hypericum perforatum</i>	Sint-Janskruid	g	hemicryptofyt
<i>Hypochaeris radicata</i>	Gewoon biggenkruid	g	hemicryptofyt
<i>Inula conyza</i>	Donderkruid	s	hemicryptofyt
<i>Juncus effusus</i>	Pitrus	g	hemicryptofyt
<i>Juncus tenuis</i>	Tengere rus	g	hemicryptofyt
<i>Kickxia elatine</i>	Spiesleeuwenbek	s	therofyt
<i>Knautia arvensis</i>	Beemdkroon	s	hemicryptofyt
<i>Koeleria sp.</i>	Fakkelgras sp.	s	hemicryptofyt
<i>Lapsana communis</i>	Akkerkool	g	therofyt
<i>Leontodon hispidus</i>	Ruige leeuwentand	s	hemicryptofyt
<i>Leucanthemum vulgare</i>	Gewone margriet	g	hemicryptofyt
<i>Linaria vulgaris</i>	Vlasbekje	g	geofyt
<i>Lolium perenne</i>	Engels raaigras	g	hemicryptofyt
<i>Lotus corniculatus</i>	Gewone rolklaver	g	hemicryptofyt
<i>Luzula campestris</i>	Gewone veldbies	g	hemicryptofyt
<i>Medicago lupulina</i>	Hopklaver	g	hemicryptofyt
<i>Mercurialis annua</i>	Tuinbingelkruid	g	therofyt
<i>Moehringia trinervia</i>	Drienermuur	g	hemicryptofyt
<i>Myosotis arvensis</i>	Akkervergeet-mij-nietje	g	therofyt
<i>Origanum vulgare</i>	Wilde marjolein	s	hemicryptofyt
<i>Papaver rhoeas</i>	Gewone klaproos	g	therofyt
<i>Picris hieracioides</i>	Echt bitterkruid	s	hemicryptofyt
<i>Pimpinella saxifraga</i>	Kleine bevernel	s	hemicryptofyt
<i>Plantago lanceolata</i>	Smalle weegbree	g	hemicryptofyt
<i>Plantago major</i>	Grote weegbree	s	hemicryptofyt
<i>Poa annua</i>	Straatgras	g	therofyt
<i>Poaceae sp.</i>	Gras sp.	/	/
<i>Poaceae sp.</i>	Gras sp.	/	/
<i>Poaceae sp.</i>	Gras sp.	/	/
<i>Poaceae sp.</i>	Gras sp.	/	/
<i>Poaceae sp.</i>	Gras sp.	/	/

<i>Poa pratensis</i>	Veldbeemdgras	s	hemicryptofyt
<i>Poa sp.</i>	<i>Poa sp.</i>	/	/
<i>Polygala vulgaris</i>	Gewone vleugeltjesbloem	s	hemicryptofyt
<i>Potentilla neumanniana</i>	Voorjaarsganzerik	s	hemicryptofyt
<i>Prunella vulgaris</i>	Gewone brunel	g	chamaeofyt
<i>Ranunculus bulbosus</i>	Knolboterbloem	s	geofyt
<i>Ranunculus repens</i>	kruipe boterbloem	g	hemicryptofyt
<i>Ranunculus sceleratus</i>	Blaartrekkende boterbloem	g	therofyt
<i>Reseda luteola</i>	Wouw	g	hemicryptofyt
<i>Rorippa sylvestris</i>	Akkerkers	g	hemicryptofyt
<i>Rubus fruticosus</i>	Gewone braam	g	fanerofyt
<i>Rumex obtusifolius</i>	Ridderzuring	g	hemicryptofyt
<i>Sanguisorba minor</i>	Kleine pimpernel	s	hemicryptofyt
<i>Sedum acre</i>	Muurpeper	s	chamaeofyt
<i>Sedum album</i>	Wit vetkruid	s	chamaeofyt
<i>Senecio jacobea</i>	Jacobskruid	g	hemicryptofyt
<i>Senecio vulgaris</i>	Klein kruiskruid	g	hemicryptofyt
<i>Sinapis alba</i>	Witte mosterd	g	therofyt
<i>Solanum dulcamara</i>	Bitterzoet	g	fanerofyt
<i>Sonchus asper</i>	Gekroesde melkdistel	g	therofyt
<i>Sonchus oleratus</i>	Gewone melkdistel	s	hemicryptofyt
Sp. non. det.	Onbekend	/	/
<i>Stellaria aquatica</i>	Watermuur	g	hemicryptofyt
<i>Stellaria media</i>	Vogelmuur	g	therofyt
<i>Sisymbrium officinale</i>	Gewone raket	g	therofyt
<i>Taraxacum officinalis</i>	Paardenbloem	g	hemicryptofyt
<i>Teucrium chamaedrys</i>	Echte gamander	s	fanerofyt
<i>Teucrium scorodonia</i>	Valse salie	g	chamaeofyt
<i>Thymus praecox</i>	Kruiptijm	s	fanerofyt
<i>Thymus pulegioides</i>	Grote tijm	s	fanerofyt
<i>Torilis japonica</i>	Heggedoornzaad	g	hemicryptofyt
<i>Trifolium campestre</i>	Liggende klaver	g	hemicryptofyt
<i>Trifolium hybridum</i>	Basterdklaver	g	hemicryptofyt
<i>Trifolium medium</i>	Bochtige klaver	s	hemicryptofyt
<i>Trifolium repens</i>	Witte klaver	g	hemicryptofyt
<i>Urtica dioica</i>	Grote brandnetel	g	chamaeofyt
<i>Verbascum thapsus</i>	Koningskaars	g	hemicryptofyt
<i>Veronica arvensis</i>	Veldereprijs	g	therofyt
<i>Veronica officinalis</i>	Mannetjesereprijs	s	chamaeofyt
<i>Veronica serpyllifolia</i>	Tijmereprijs	s	hemicryptofyt
<i>Veronica sp.</i>	Ereprijs sp.	g	chamaeofyt
<i>Viccia cracca</i>	Vogelwikke	g	hemicryptofyt
<i>Viccia hirsuta</i>	Ringelwikke	g	therofyt
<i>Viccia tetraspermum</i>	Vierzadige wikke	g	hemicryptofyt
<i>Viola hirsuta</i>	Ruig viooltje	s	hemicryptofyt

AFDELING PLANTENDIVERSITEIT EN POPULATIEBIOLOGIE

Kasteelpark Arenberg 31 bus 2435

3000 LEUVEN, BELGIË

Tel: +32 (0)16 32 15 20

Fax: +32 (0)16 32 19 68

olivier.honnay@bio.kuleuven.be

www.kuleuven.be

