TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION 4

1.1. Contexte général 4

1.2.Le Palissandre : enjeux économiques et de conservation 5

1.3. Objectifs de l'étude 6

1.4. Marqueurs moléculaires : historique et intérêts 6

2. MATERIELS ET METHODES 8

2.1. Matériel végétal 9

2.1.1. Le palissandre (Dalbergia sp) 9
2.1.2. Dalbergia monticola 9
2.1.3. Présentation des sites 14

2.2. Recueil des données sur Dalbergia monticola 18

2.2.1. Bibliographie 18
2.2.2. Enquêtes 18
2.2.3. Discussions informelles 18

2.3. Marquage moléculaire pour l'étude de la diversité génétique 19

2.3.1. Récoltes des échantillons 19
2.3.2. Techniques de marquage par RAPD 20
2.3.3. Analyses statistiques 23

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS 28

3.1. Diversité génétique 28

3.1.1. Diversité globale des populations 28
3.1.2. Relation entre les individus 32
3.1.3. Variabilité intra et inter-populations 32
3.1.4. Distances génétiques intra populations 34
3.1.5. Corrélation entre les distances géographiques et les distances génétiques 36
3.1.5. Axes de discussion 37

3.2. Facteurs socio-économiques liés à la gestion des ressources génétiques de l'espèce 40

3.2.1. Aspects socio-économiques liés à la gestion des forêts étudiées 40
3.2.2. Impacts sur les ressources génétiques de l'espèce 42

3.3. Recommandations et actions à entreprendre pour la gestion des ressources génétiques de Dalbergia monticola 42

4. CONCLUSIONS 45

BIBLIOGRAPHIE 47

ANNEXES 49

Annexe 1 : Extrait du Plan National Stratégique de Gestion des Ressources Phytogénétiques forestières 50

Annexe 2 : Caractéristiques des individus par population 51

Annexe 3 : Formulaire d'enquête 54

Annexe 4 : Technique d'extraction d'ADN 55

Annexe 5 : Exemple des résultats d'analyse de variance 56

1. INTRODUCTION

1.1. Contexte général

Au niveau mondial, la dégradation de l'environnement était signalée depuis des dizaines d'années. Cela est dû à des différentes causes telles que la pollution, les activités anthropiques de l'homme, le cataclysme naturel .... A Madagascar, des grandes menaces pèsent surtout sur les ressources forestières. Depuis la 2 ème moitié du 20 ème siècle, sa superficie forestière ne cesse pas de diminuer d'année en année. De 1960 à 1994, 5 millions d'hectares des forêts sont disparus dus à des exploitations abusives (B Charbonnier, 1998). Par suite de ces dernières, plusieurs espèces forestières malgaches sont signalées actuellement en voie d'extinction.

Face à ces problèmes de l'environnement, plusieurs pays ont déjà mis en place une politique de gestion de leur biodiversité. Cela s'est marquée par l'engagement croissant des pays signataires de la convention de RIO en 1992. Pour Madagascar, pays disposant d'une diversité biologique importante, un Plan d'Action Environnemental a été mis en œuvre depuis 1991 (PAE, 1991). Au niveau forestier, un Plan National de Gestion des Ressources Phytogénétiques Forestières a été établi et déjà mis en œuvre depuis janvier 2000 (Annexe n°1).

Dans ce plan de gestion, des espèces sont priorisées compte tenu du danger de leur disparition. Le SNGF, en tant que responsable de la distribution des matériels forestiers de production (graines et plants) à Madagascar et en tant que coordonnateur des actions de gestion prévues par le plan en question, s'intéresse particulièrement à quelques espèces ligneuses : *Evodia belahe, Dalbergia baronii, Dalbergia monticola, Dalbergia greveana, Diospyros perrieri, Khaya madagascariensis, Ocotea cymosa, Prunus africana* ...En effet, ces espèces sont très demandées par les utilisateurs.

Dans le cadre de notre étude, nous avons approfondi des connaissances sur une espèce de palissandre : *Dalbergia monticola*. Le choix de l'espèce est défini dans la 2ème partie._Cette espèce est repartie dans le domaine de forêt dense humide de moyenne altitude de l'Est de Madagascar. Différentes formes d'exploitation y sont rencontrées et par conséquent elle est menacée de disparition. Selon les axes stratégiques définis dans le plan établi, notre étude consiste à mettre en évidence des éléments de base de gestion des ressources génétiques de cette espèce en analysant sa diversité génétique et les facteurs socio-économiques liés à sa gestion.

Dans le cadre de collaboration entre SNGF et le CIRAD Forêt, nous avons pu faire un stage au niveau du laboratoire de génétique forestière à Montpellier où nous avons pu étudier la diversité génétique de *Dalbergia monticola* par les marqueurs moléculaires. Et l'étude des facteurs socio-économiques était effectuée lors de la descente sur terrain en faisant des enquêtes au niveau des acteurs dans l'exploitation de palissandre dans les régions étudiées.

1.2.Le Palissandre : enjeux économiques et de conservation

Le palissandre et l'ébène figurent parmi les bois très recherchés dans le commerce. Ils sont classés en 2ème catégorie dans la liste de classification du bois à Madagascar. Le palissandre malgache, vu sa qualité et sa valeur technologique importante, est très demandé tant au niveau national qu'à l'étranger (en tant que bois d'œuvre et en ébénisterie). Pour l'année 1999, la quantité exportée avoisinait 1050 m3 correspondant à une valeur supérieure à 2 milliards francs fmg (source : Rapport DEF 1999). Les chiffres obtenus au niveau des ports maritimes de Toamasina, Morondava et Mahajanga donnent une valeur totale près de 3200 m3 concernant l'exportation de palissandre en 1999 (Rapport de stage de Rija Andriambanona, Caroline I Bauchaine *et al,* 2001). Cela montre qu'il est une des sources de devises non négligeables pour l'économie malgache. Par conséquent, son exploitation est très intense et il y a des risques de pertes considérables au niveau des ressources génétiques de certaines espèces.

En outre, le palissandre malgache a une diversité spécifique importante. 42 espèces sont endémiques. Chaque zone phytogéographique de Madagascar présente des espèces adaptables à des conditions écologiques du milieu. Elles ont de morphologie et caractéristiques différentes. Pour *Dalbergia monticola*, une des espèces de palissandre dans la région Est de Madagascar, plus précisément dans zone de moyen altitude de l'Est, elle présente une productivité plus importante par rapport aux autres espèces de palissandre et par conséquent elle est très exploitée. La rareté des pieds est confirmée dans le rapport de stage de Urs Arnold et Liva Andrianaivo en janvier 2000.. Des mesures de gestion des ressources résiduelles sont alors urgentes pour l'espèce afin d'assurer leur pérennité et leur renouvellement. Cela conduit notamment à la caractérisation des populations in-situ. Pour ces dernières, la connaissance de leur différenciation génétique et des facteurs socio-économiques intervenant sont nécessaires afin de bien élaborer une stratégie de gestion durable.

1.3. Objectifs de l'étude

L'étude entre dans le cadre de gestion de ressources phytogénétiques forestières à Madagascar en suivant les axes stratégiques définis dans le plan de gestion.

* Objectif global

L'objectif global est d'initier les actions de gestion à moyen et long terme des ressources génétiques de *Dalbergia monticola* par le biais de la connaissance de leur variabilité génétique et les aspects socio-économiques leur concernant.

* Objectifs spécifiques

Pour atteindre cet objectif global, des objectifs spécifiques suivant ont été définis :

- connaissance de l'aire de distribution résiduelle de l'espèce,
- établissement de sa diversité génétique inter et intra population sur la base de marqueurs moléculaires
- acquisition d'informations socio-économiques à différents niveaux (local, régional et national) sur l'espèce.

1.4. Marqueurs moléculaires : historique et intérêts

Les premiers moyens de description et de mesure de la diversité génétique ont été réalisés à partir des caractères phénotypiques (morphologiques ou agronomiques). Mais ces derniers sont soumis à une variation continue, à des interactions avec les facteurs du milieu. Depuis une dizaine d'années, grâce à l'évolution de la biologie moléculaire, l'étude de la variabilité génétique pour certaines plantes peut s'effectuer à l'aide de marqueurs proches du génome qui ne sont pas soumis aux effets de l'environnement.

Les marqueurs moléculaires permettent :

- d'analyser des flux de gènes et des régimes de reproduction,
- d'observer le polymorphisme de séquences de l'ADN (Acide désoxyribonucléique),
- d'étudier la structuration de la variabilité génétique au sein d'une espèce.

Actuellement, plusieurs types de marqueurs sont développés et on peut distinguer en deux catégories (L Grivet, JL Noyer) :

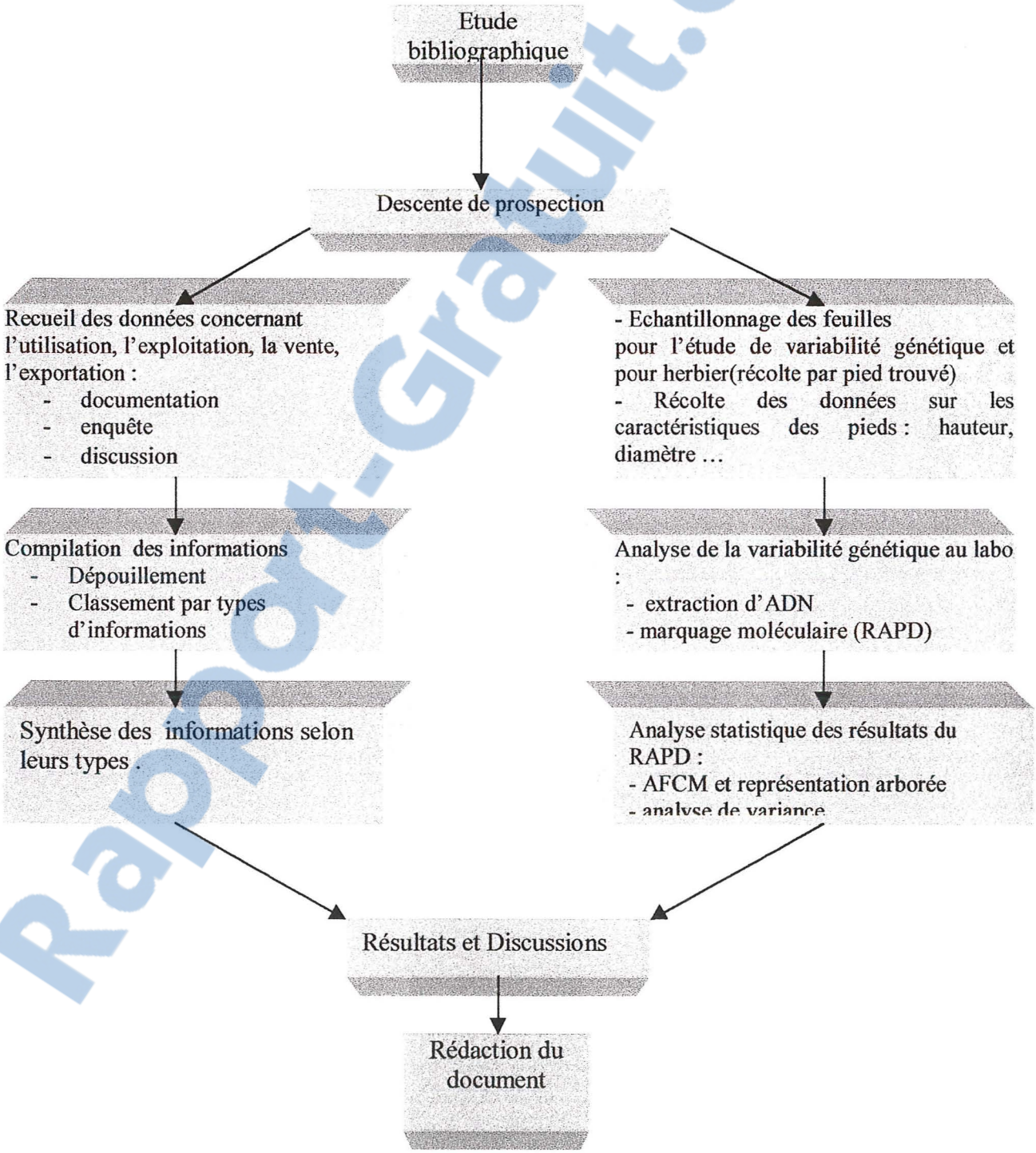
- les marqueurs multialléliques comme les iso enzymes (marqueur biochimique) les RFLP et les microsatellites. Ces marqueurs permettent de révéler une série de plusieurs allèles pour chaque locus étudié.

- les marqueurs de type empreinte génétique : les RAPD et les AFLP. Ce sont des marqueurs dominants et ils permettent de révéler la présence ou l'absence d'un seul allèle pour chaque locus, et cela simultanément pour un grand nombre de locus.
La technique des marqueurs RAPD qui a été utilisée dans l'étude sera développée dans la 2ème partie.

➔ Cette présente étude nous donne donc des informations sur la diversité génétique au sein et entre les populations résiduelles de *Dalbergia monticola* en utilisant les techniques de marquage moléculaire. Et avec les résultats d'analyse des facteurs socio-économiques, nous avons essayé de mettre dans la dernière partie des recommandations et des actions à entreprendre pour la gestion future des ressources génétiques de l'espèce.

2. MATERIELS ET METHODES

Cette partie représente le matériel végétal étudié, le mode de recueil des données concernant l'espèce et les différentes étapes à suivre pour l'étude de variabilité génétique à l'aide de marqueur moléculaire. La méthodologie suivie depuis le début de cette recherche est résumé dans le schéma ci-dessous.



Rapport-Gratuit.com

2.1. Matériel végétal

2.1.1. Le palissandre (Dalbergia sp)

Le genre Dalbergia appartient à l'embranchement des spermaphytes,
Sous embranchement : Angiospermes.
Classe : Dicotyledon
Ordre : Fabalés
Familles : Fabaceae
Sous famille : Papillonoideae
Genre : Dalbergia

Les espèces de Dalbergia ont des aspects différents : arbres, arbustes ou lianes. A Madagascar, 43 espèces sont décrites dont 42 sont endémiques (Bosser et RABEVOHITRA, 1996). Une seule espèce est une liane (*Dalbergia bracteolata*) .

Concernant l'aire écologique, tous les domaines phytogéographiques de Madagascar présentent des espèces de Dalbergia sauf les zones à haute altitude.

25 espèces parmi les 43 décrites donnent du bois de palissandre de bonne qualité. Actuellement, certaines espèces sont devenues rares dû à l'exploitation abusive comme le *Dalbergia monticola*, *Dalbergia baronii* et le *Dalbergia greveana* (Arnold et Andrianaivo, Rapport de stage 2000) et aussi suite à la disparition de certains écosystèmes forestiers par la pratique de l'agriculture sur brûlis.

2.1.2. Dalbergia monticola

a- Choix de l'espèce

Avec l'élaboration du Plan stratégique de gestion des ressources phytogénétiques forestières à Madagascar, *Dalbergia monticola* était signalée parmi les espèces prioritaires compte tenu des importantes menaces sur les populations résiduelles. Le résultat de notre stage (année 2000) dans la mise en œuvre de ce plan confirme sa rareté.

Elle se caractérise aussi par sa grande taille (hauteur atteignant 30 m avec un diamètre de 1 m) et son aire naturelle précisément décrite.

b- Noms vernaculaires

Le Dalbergia est connu sous le nom commercial "Palissandre". A Madagascar, le Dalbergia est appelé Voamboana ou Manary. L'espèce *Dalbergia monticola* est connue sous différentes appellations : Voamboana (à Ankeniheny), Voamboana atin'akoho (à Ranomafana), Voambona mavokely (à Didy), Hazovola (Andilamena). Les gens mettent le nom parfois suivant la couleur du cœur du bois.

c- Botaniques et phénologie de l'espèce

C'est un arbre qui peut atteindre de 20 à 30 m de hauteur avec un diamètre jusqu'à 1 m. L'écorce est grisâtre et un peu écailleuse. Le bois a une couleur variable selon la taille : blanc jaunâtre, rose violacé et brun à violet. Sa qualité lourde et dur permet de l'utiliser à des différents usages.

Les feuilles :

Les feuilles sont composées et semi-caduques. Elles ont une longueur variant entre 3.5 et 12 cm; avec des folioles de 20 à 30 à limbe obovale à oblongue. Ces folioles sont très coriaces, arrondies et souvent un peu retuses au sommet, arrondies à la base. Elles sont glabres et luisantes sur la face supérieure et pubescentes blanchâtre à jaune pâle plus ou moins dense sur la face inférieure. Le pétiole et les pétiolules sont densément pubescents -hérissés.

Les inflorescences :

Les inflorescences sont terminales, paniculiformes et parfois axillaires. Les axes, les rameaux et les pédicelles sont densément pubescents. Les fleurs sont blanches et ont une longueur de 4.5 à 6 mm.

Les fruits :

Les fruits sont de couleur brune rougeâtre, d'une forme elliptique à oblong et sont aigus ou atténués au sommet et cunéiformes à la base. Ils existent des mono-, di- et tri spermes. Les monospermes mesurent 3.5-4.5 x 1.3-1.5 cm, les dispermes ont une longueur de 6-7 cm et les trispermes sont 7-9 cm de long. Les graines sont sub-réniformes, de couleur brun rougeâtre.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

La floraison :

La période de floraison se situe du mois d'août au mois de novembre et la fructification commence à partir de novembre jusqu'au mois de mars. La Figure n°1 montre les aspects des feuilles, des fleurs et des fruits de l'espèce.

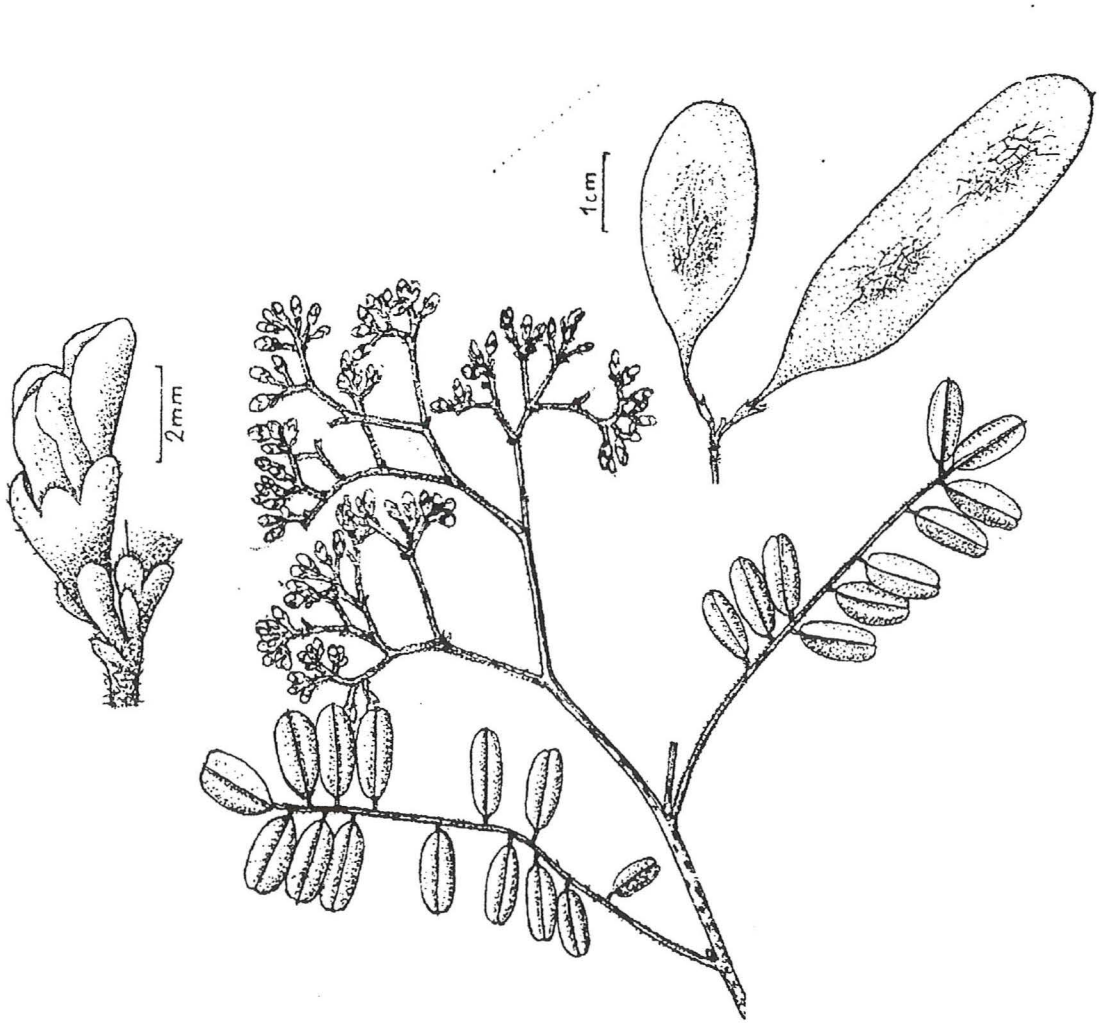


Figure 1 : Aspects des feuilles, fleurs et fruits de *Dalbergia monticola*
(Auteurs : Jean BOSSER et Raymond RABEVOHITRA)

- La dissémination des pollen et des graines

En général, dans les forêts naturelles, la pollinisation est assurée par des différents agents pollinisateurs comme les insectes, le vent, ... Pour cette espèce, des connaissances sur le mode de dissémination de pollen et des graines font encore défaut. D'après notre observation et les enquêtes qu'on a fait auprès des riverains, les deux types de dissémination anémophile et entomophile peuvent se rencontrer.

Concernant les graines, le fait de trouver des régénérations et des fruits dans un périmètre proche de l'arbre (rayon de 10 à 20 m autour du pied de l'arbre) indique que le mode de dissémination est surtout barochore.

d- Aire de distribution

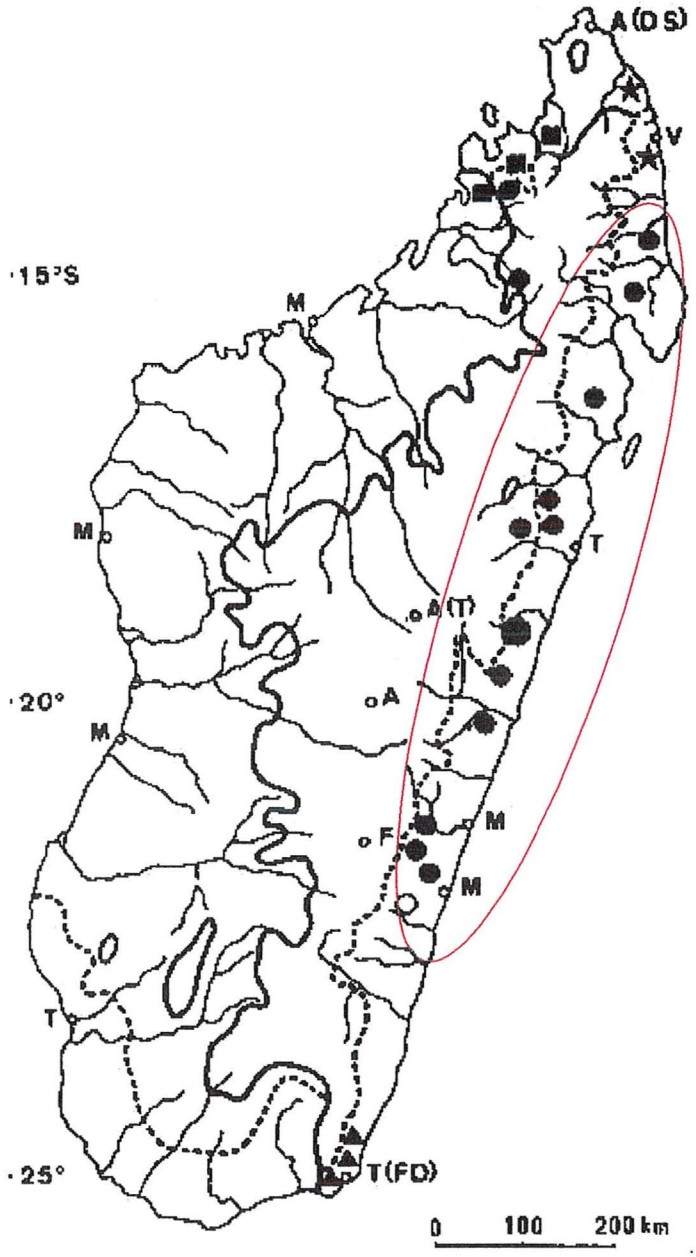
L'aire naturelle du *Dalbergia monticola* s'étend sur le domaine oriental de moyenne altitude de Madagascar (altitude variant entre 350 et 1600 m). Elle s'étend jusqu'à Tolongoina et Fort Carnot au Sud et à Antalaha au Nord. Sa zone écologique est caractérisée par une pluviométrie annuelle située entre 750 à 2500 mm/an et une température moyenne annuelle variant entre 18 et 23° C. Le sol a une texture argilo-sableux. Actuellement, dû à l'exploitation, il est difficile de trouver des arbres de grande taille pour cette espèce. La carte n°1 nous indique son aire de répartition.

e- Utilisation

La haute qualité de bois et la grande taille positionne l'espèce parmi les espèces forestières les plus exploitées à Madagascar pour la fabrication des meubles et l'ébénisterie. Par conséquent, on ne trouve plus de grands pieds dans les endroits qui sont accessibles par les exploitants et la population riveraine.

Comme forme d'exploitation, les bûcherons font l'équarrissage et le sciage des bois sur place (dans la forêt) en forme de bois carré, de planches ou de traverses. Les produits sont transportés à dos d'homme jusqu'à l'endroit où les camions peuvent les embarquer pour les marchés de bois à Antananarivo ou au port maritime de Tamatave.

● ***D. monticola***



Carte 1 : Aire de distribution de *Dalbergia monticola*

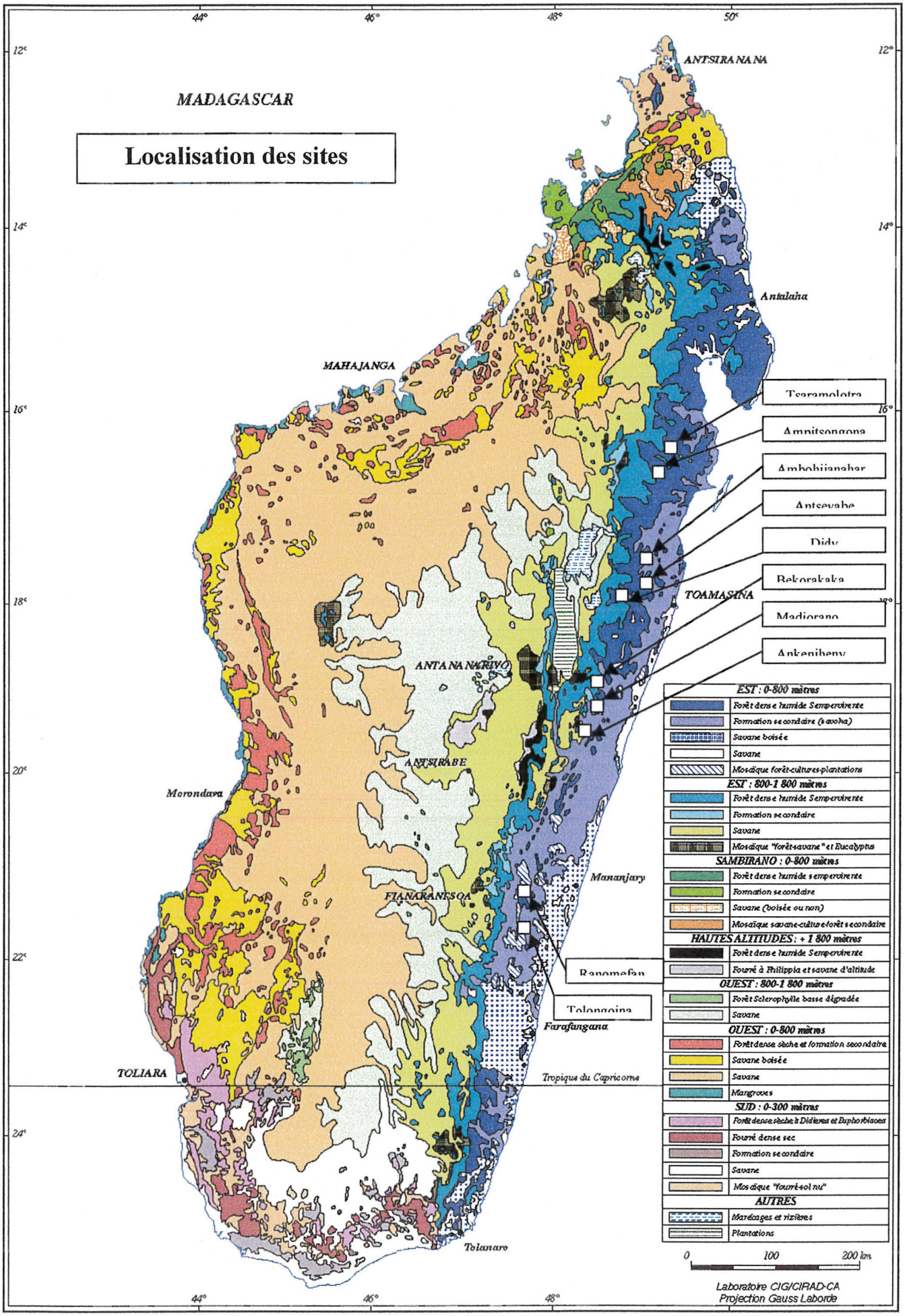
2.1.3. Présentation des sites

Le choix des sites d'abord a été fait dans le but de couvrir le maximum possible de toute l'aire naturelle de l'espèce pour mieux représenter la variabilité au niveau des provenances. Les sites sont identifiés à partir des documentations et des enquêtes préalables auprès des chercheurs et des responsables des services forestiers. Certains étaient déjà identifiés depuis notre stage sur la mise en œuvre du Plan de gestion. Dix sites ont été choisis finalement, à savoir :

- dans le domaine du Centre : Bekorakaka, Madiorano et Ankeniheny
- dans le domaine du Sud : Ranomafana et Tolongoina
- dans le domaine du Centre Nord : Didy, Ambohijanahary, Antsevabe
- et du Nord : Ampitsongoina, Tsaramolotra

La zone d'étude se situe dans les régions de moyenne altitude de Madagascar . Les caractéristiques de chaque site sont résumées dans les tableaux ci après.

La carte 2 présente la localisation de ces différents sites.



Carte 2 : localisation des différents sites

- Domaines Centre et Sud Est :

Tableau 1 : Caractéristiques des sites des domaine Centre Est et Sud Est

Situation	Bekorakaka (Bk)	Madiorano (Md)	Ankeniheny (Ak)	Ranomafana (Rn)	Tolongoina (T)
Administrative Province : Préfecture : Commune : Village :	Toamasina Moramanga Moramanga, Lakato et Anosibe An'ala Bekorakaka	Madiorano	Ankeniheny	Fianarantsoa Fianarantsoa II Ifanadiana Ankerana	Fianarantsoa Ikongo Tolongoina Malazamasina
Géographique Altitude : Latitude : Longitude :	850 - 900 m 19°06 S 48°21 E	800 – 1100 m 19°02' S - 19°18' S 48°12' E – 48°23' E		943 m 21°16'63 S 47°26'68 E	800 – 1200 m 21°34' S 47°32' E
Climatique $T°_{ma}$: $P°_{ma}$:	Climat tropical humide min : 10,1 °C ; max : 26,2 ° C 1790 – 2190 mm			min : 16 °C ; max : 27,4 °C 2922 mm	2800 mm
Statut de la forêt	Forêts classées (très dégradées)			Forêt privée (dégradée)	Forêt communautaire (écrémée)

Sources :

- Schéma d'aménagement d'une forêt classée pilote en zone humide. Forêt d'Ankeniheny. DEF/ CI
- Inventaire des légumineuses à nodosités dans le Parc National de Ranomafana. RASAMOELINA A S, Mémoire de CAPEN, 1993
- Plan d'Aménagement – Forêt Villageoise de Malazamasina. MEF, Projet CAF/ APN

- Domaines Nord :

Tableau 2 : Caractéristiques des sites des domaines Nord et Centre Nord

Situation	Didy (Dd)	Antsevabe (At)	Ambojanahary (Ab)	Tsaramolotra (Ts)	Ampitsongona
Administrative					
Province :	Toamasina			Toamasina	
Préfecture :	Ambatondrazaka			Andilamena	
Commune :	Didy	Antsevabe	Manakambahiny	Andilamena	
Village :	Anjohibe	Antsevabe	Ambohijanahary	Behorefo	Sahavolo
Géographique					
Altitude :	800 – 900 m			905 – 1236 m	
Latitude :	18°10'	17°55' S	17°45' S	16°57' S	17°05' S
Longitude :	48°35'	48°32' E	48°35' E	48°44' E	48° 42' E
Climatique					
$T°_{ma}$:	21 °C (max : 29° ; min : 12° C)			min : 12 °C ; max : 28 °C	
$P°_{ma}$:	1240 mm			750 mm	
Statut de la forêt	Comprises dans la forêt classée d'Ambohilero (dégradée)			Forêts domaniales (très dégradées)	

Sources :

- Limites et dynamique coutumières dans la forêt classée d'Ambohilero SE d'Ambatondrazaka. B Charbonnier- Mémoire Mastère en Foresterie,1998

- Génie Rurale Andilamena, mai 2001

2.2. Recueil des données sur Dalbergia monticola

Cette partie concerne le mode de collecte des données qui permettent de connaître les facteurs socio-économiques liés à la gestion des ressources de palissandre en particulier l'espèce.

2.2.1. Bibliographie

Le but, c'est d'avoir des informations disponibles sur les forêts ou sites où nous avons mené l'étude. Elle était effectuée au niveau des différentes institutions ou organismes qui détiennent les documents concernant les études socio-économiques déjà faites. Il s'agit des projet de conservation ou de gestion des forêts comme le Projet MIRAY, Le CAF à Tolongoina, les services forestiers (CIREF et CEF). Les types d'informations recueillies concernent surtout les ressources existantes dans la région, les différentes formes d'exploitation forestière, le rôle des populations riveraines et les menaces pour l'espèce en question.

2.2.2. Enquêtes

Des enquêtes ont été effectuées lors de notre descente sur le terrain. Le but, c'est d'avoir plus d'information sur les aspects socio-économiques liés à la gestion des forêts en question aux niveaux locaux, régionaux et nationaux. L'enquête a été menée sous forme libre. Des questions ont cependant été formulées à l'avance pour mieux la guider (annexe 3). Elles ont concerné surtout le mode de gestion, les différents types d'exploitation, l'utilisation de l'espèce et les menaces de la forêt et l'espèce en question. Les différents acteurs qui sont impliqués directement à la gestion ou l'exploitation des forêts visitées ont été parmi les enquêtés. Il s'agit des populations riveraines, des exploitants et des agents forestiers responsables des régions étudiées.

2.2.3. Discussions informelles

Cela était effectué avec les populations riveraines ou des guides locales qui étaient avec nous lors du travaux de collecte des échantillons de l'espèces. Cette discussion nous permet d'avoir des idées sur la pensée de riverains sur l'avenir de la forêt en question et de connaître leur proposition sur la gestion future.

Rapport-Gratuit.com

2.3. Marquage moléculaire pour l'étude de la diversité génétique

2.3.1. Récoltes des échantillons

Dû à la rareté des pieds de l'espèce, nous avons pris toutes les catégories des individus trouvés dans l'échantillonnage : des grands pieds (DHP > 35 cm), des jeunes arbres et des régénérations (DHP < 10 cm). La distance entre deux individus consécutifs est très variable. Elle est située entre 20 à 1500 m. Le nombre des échantillons par site dépend aussi du nombre des pieds trouvés. Le tableau ci-après résume les taux des échantillons récoltés par site. Les caractéristiques de chaque individu sont illustrées dans l'annexe 2.

Tableau 3 : Nombre d'échantillons par site

Domaine	Sites	Nombre de pieds
Centre	Bekorakaka (Bk)	9
	Madiorano (Md)	6
	Ankeniheny (Ak)	6
Sud	Ranomafana (Rn)	20
	Tolongoina (T)	19
Centre Nord	Didy (Dd)	16
	Antsevabe (At)	10
	Ambohijanahary (Ab)	10
Nord	Tsaramolotra (Ts)	10
	Ampitsongona (Ap)	8

Distance entre les pieds = distance entre deux pieds consécutifs où on a fait des récoltes d'échantillons

Pour les espèces forestières, les feuilles sont le matériel végétal le plus utilisé dans l'étude de variabilité génétique par marqueurs moléculaires. Des échantillons des feuilles saines ont été récoltés sur chaque individu à étudier. Dû à la rareté des pieds de cette espèce, la récolte était faite sur chaque individu trouvé. Chaque échantillon par individu était conditionné selon les procédures de séchage avec du silicagel pendant 48 heures.

2.3.2. Techniques de marquage par RAPD

a- Extraction de l'ADN des feuilles

L'étude de la variabilité est faite à partir de l'ADN des feuilles des individus étudiés. Leur extraction a été effectuée au Laboratoire de FOFIFA/DRFP d'Ambatobe à Madagascar en appliquant la méthode de Shaghai Marot, Gawel et Jarret, 1991. Le processus d'extraction définie par cette méthode est résumé dans l'annexe 4. L'ADN est extrait à partir de 100 mg de feuilles sèches, puis conservé à –20 °C.

b- Contrôle de la qualité et dosage de l'ADN

La concentration idéale pour les solutions de travail est à 3 ng/µl. De contrôle des échantillons d'ADN doit être effectuée en vérifiant la qualité et la quantité de l'ADN extrait est donc nécessaire pour qu'on puisse connaître leur concentration afin de les doser. Elle était fait par électrophorèse sur gel d'agarose (solution utilisée pour l'électrophorèse) en utilisant des ADN témoins (concentration connue).

c- Le processus RAPD

La technique RAPD (Random amplified Polymorphism DNA) a été retenue pour l'investigation de la diversité génétique globale de l'espèce. Elle permet d'avoir des résultats rapides. Elle est basée sur le principe de la Polymérisation Reaction Chain (PCR). Cette dernière est une technique d'amplification enzymatique in vitro de l'ADN. Elle consiste à amplifier le fragment d'ADN encadré par deux amorces identiques.

Choix des amorces

Les **amorces** sont des nucléotides de petites tailles, de séquence aléatoire. L'amorce va se fixer sur le brin d'ADN chaque fois qu'elle trouve une séquence complémentaire et l'amplification y aura lieu.

Parmi les 48 amorces que nous avons testées sur 4 individus de sites différents, 15 ont été retenues car fournissant les profils à fort polymorphisme. Tous les individus ont ensuite été amplifiés par ces amorces.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Amplification de l'ADN (Principe de la PCR)

L'amplification est un cycle qui se fait en 3 phases distinctes :

1ère phase : la dénaturation de l'ADN à une température de 95 °C qui entraîne la séparation des deux brins d'ADN.

2ème phase : la fixation des amorces sur les brins séparés dans l'endroit où il y a leur séquence complémentaire.

3ème phase : l'élongation des fragments d'ADN par un ADN polymérase thermostable (la *Taq* polymérase).

Le cycle se répète n fois et à chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN est doublé. D'où après n cycles, on aura 2n molécules d'ADN.

Les différentes conditions de manipulations sont résumées dans l'annexe …

Investigation du polymorphisme

Les produits d'amplification ont été déposés sur le gel d'agarose pour les faire migrer dans un champ électrophorétique. Les fragments d'ADN se séparent selon leur taille : les molécules plus grandes sont davantage retenues que les plus petites et migrent moins vite vers l'anode.

Après la migration, le gel est trempé dans une solution contenant du bromure d'éthidium. Cette molécule s'intercale entre les bases de l'ADN et permet de visualiser les fragments amplifiés sous une lampe à ultraviolets. Chaque fragment se présente sous forme d'une bande blanche (Photo 1). La taille de chaque fragment est déterminée en comparant leur mobilité électrophorétique à celle de fragments d'ADN de taille déterminée appelé marqueur de taille.

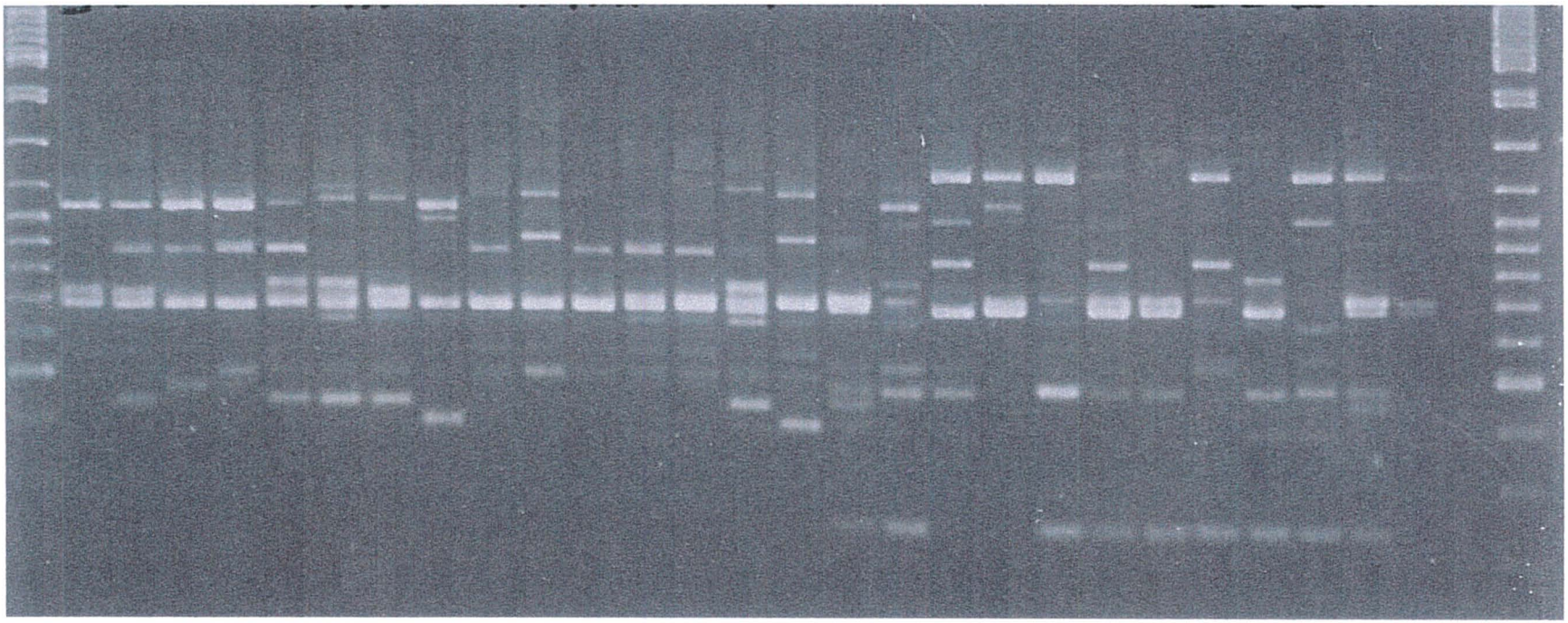


Photo 1 : Photographie d'un gel, pour 26 individus - Amorces B11

2.3.3. Analyses statistiques

a- L'analyse des données RAPD

Les données issues de la lecture des bandes sur la photographie de gel sont sous forme d'une matrice de 1 et de 0. Cette dernière indique la présence (1) ou l'absence (0) d'une bande de taille définie pour chaque individu. Dans le tableau des données, chaque ligne correspond à un individu et chaque colonne à un marqueur (variable). L'analyse statistique des données a été effectuée par les logiciels Xlstat ayant la méthode d'analyse factoriels des données et Darwin 3.5 (Dissimilarity analysis and representation) donnant des résultats d'analyse sous forme de graphique.

Analyse factorielle des données

L'analyse factorielle des correspondances multiples a été appliquée avec le logiciel Xlstat pour traiter les données. Cela conduit à la construction d'un tableau disjonctif Complet (voir tableau ci dessous). Chaque variable (marqueur) est représentée par une modalité. L'individu prend la valeur 1 si la modalité est présente et 0 sinon. L'ensemble des données est un tableau à n lignes et J colonnes où J est le nombre total de modalité.

Tableau 4 : Forme de Tableau Disjonctif Complet dans notre cas

	Variable 1		Variable 2		.....		Variable Q-1		Variable Q	
Individu 1	0	1	1	0						
Individu 2	1	0	1	0						
.....	.	.								
.....	.	.								
Individu n-1	1	0	0	1						
Individu n	1	0	1	0						

Q : nombre totale des variables (marqueurs)

Variable : locus marqueurs

Les résultats sont présentés sous forme de graphiques. Ces derniers montrent la répartition de nuages des points (des individus) selon les axes. Les axes factoriels sont construits de façon à maximiser la diversité prise en compte. Un point est bien représenté sur un axe si son cosinus carré par rapport à cet axe est proche de 1 et sa contribution est élevée.

La considération de la contribution des points sur l'axe est aussi nécessaire car l'explication est basée sur les éléments les plus contributifs dans l'axe. Des exemples sur les résultats d'analyse des données sur l'AFCM sont présentés dans l'annexe 5.

* *Représentation arborée des dissimilarités*

L'analyse factorielle a été complétée par les méthodes de représentation arborée en utilisant le logiciel Darwin (Perrier *et al*, 1999). Cela consiste à représenter sous forme d'un arbre (avec ramification) la distance entre deux et des individus. Cette représentation permet de décrire les relations entre individus tandis que l'analyse factorielle essaie de représenter globalement la diversité des populations. Elle est définie par une distance d représentable sous forme d'un arbre : ultramétrique ou distance additive d'arbre (voir Figure 2) (Barthelemy et Guenoche, 1988). Le calcul est basé sur un choix d'indice de similarité. Il s'agit de définir une mesure de la ressemblance (similarité) entre deux individus ou plutôt de façon équivalente, de la dissemblance (dissimilarité) puisque l'on peut passer l'une à l'autre par une transformation linéaire.

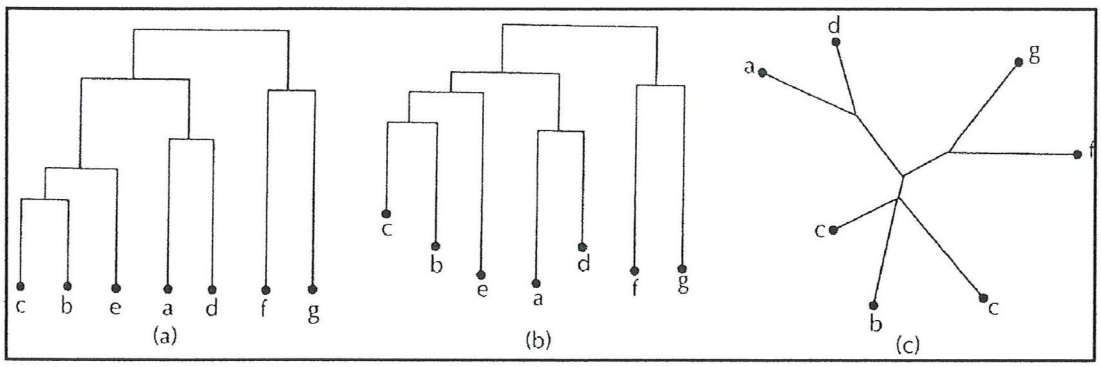


Figure 2 : Arbre sous forme ultramétrique (a) et distance additive en représentation hiérarchique (b) ou radiale (c)

- ***Indice de similarité*** :

A partir de l'indice de similarité, on peut comparer les individus deux à deux. Dans le cas de RAPD, il est préferable de prendre l'indice de Sokal et Michener où les coïncidences de 1 et de 0 sont prises en compte dans l'analyse de tous les individus.

L'indice de Sokal et Michener est définie comme :

$$sSM_{ij} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

avec a : nombre de fragments communs à deux individus j et k

b : nombre de fragments présents chez j, absents chez k

c : nombre de fragments absents chez j, présents chez k

d : nombre de fragments absents chez j et k

Les valeurs de ces indices sont comprises entre 0 et 1. Si la valeur est proche de 1, cela veut dire que les deux individus sont très ressemblants génétiquement.

- ***La distance génétique***

Deux types de distances ont été calculés :

➔A partir de la matrice de 1 et de 0 de tous les individus de chaque population, le calcul des distances génétiques est donné par la formule :

D = 1 – Indice de similarité

➔ A partir de calcul sur les moyennes de présence de fragment (valeur 1) par population, la distance est calculée par la distance euclidienne

$$D(p,q) = \sqrt{\sum_{k=1}^{k} (X_{pk} - X_{qk})^2}$$

X : fréquence du phénotype présence de la bande

p , q : deux populations différentes

k : variable

- ***Méthode de Structuration de l'arbre***

Dans notre cas présent, avec de nombre important d'individus, nous utilisons la méthode de Neighbor Joining tree (Njtree) pour construire l'arbre. Elle est basée sur le critère de voisinage relatif qui conduit à la minimisation de la longueur totale de l'arbre.

** Analyse de variance*

L'analyse de variance a été effectuée pour compléter les résultats d'analyse factorielle et la représentation arborée. Ces dernières sont des méthodes descriptives. Cette analyse de variance permet de calculer et de comparer la variance réelle entre les populations étudiées et la variance obtenue lors de la permutation des individus dans ces mêmes populations (Excoffier et al, 1992). Elle était effectuée avec le logiciel winAMOVA développé par Miller. Le modèle théorique de l'analyse de variance s'écrit :

$$\mathbf{X_{ik} = m + A_i + D_{ik}}$$

avec X_{ik} : valeur de (1,0) de l'individu k dans la population i

m : moyenne générale

A_i : écart factoriel

D_{ik} : écart résiduel

L'hypothèse nulle est donnée par $\sigma^2 A = 0$, c'est à dire absence de la variabilité entre les populations. Pour la tester, on affecte aléatoirement les individus dans chaque population et on recalcule la valeur des composantes de la variance. La puissance du test augmente avec le nombre de permutation. Dans notre cas le nombre de permutation est de 500.

b- La corrélation entre la distance géographique et la distance génétique

L'étude consiste à déterminer les relations entre les distances géographiques des populations étudiées et les distances génétiques obtenues dans l'analyse des données RAPD. La connaissance du degré de liaison par les coefficients de corrélation nous permet de vérifier les résultats obtenus à partir de l'analyse descriptive. A partir des données sur la distance géographique, on a pu former une matrice de distance entre les populations. Les relations entre les deux matrices sont évaluées par le coefficient de corrélation en faisant le Test de Mantel (Manly, 1967). Ce test consiste à comparer deux matrices. Ces dernières sont toutes les deux symétriques. Elles ont de la forme :

$$A = \begin{vmatrix} 0 & a_{21} & . & . & a_{n1} \\ a_{21} & 0 & . & . & a_{n2} \\ . & . & . & . & . \\ . & . & . & . & . \\ a_{n1} & a_{n2} & . & . & 0 \end{vmatrix} \quad , \quad B = \begin{vmatrix} 0 & b_{21} & . & . & b_{n1} \\ b_{21} & 0 & . & . & b_{n2} \\ . & . & . & . & . \\ . & . & . & . & . \\ b_{n1} & b_{n2} & . & . & 0 \end{vmatrix}$$

L'estimation des coefficients de corrélation est donnée par la formule :

$$R = \frac{\Sigma a_{ij} b_{ij} - \Sigma a_{ij} \Sigma b_{ij}}{\sqrt{[\{\Sigma a_{ij}^2 - (\Sigma a_{ij})^2 / m\} \{\Sigma b_{ij}^2 - (\Sigma b_{ij})^2 / m\}]}}$$

L'hypothèse nulle (Ho) testée est l'absence de corrélation entre les deux matrices. Le test était effectué avec 1000 permutations. Ces dernières sont effectuées au niveau des lignes. Chaque permutation donne la possibilité de calculer un nouveau coefficient de corrélation. 999 permutations conduisent au calcul de 999 coefficients. La valeur de R est classée au 1000 ème. Si la valeur observée est supérieure 999 valeurs, l'hypothèse nulle est rejetée au seuil de 0.001 (principe de test de randomisation).

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Cette partie concerne l'étude de la diversité génétique de l'espèce et les facteurs socio-économiques liés à la gestion de l'espèce. Au début de cette partie, il est nécessaire de rappeler que les populations étudiées sont réparties dans quatre domaines représentés chacun par 2 ou 3 sites :

- Nord : Tsaramolotra (Ts), Ampitsongoina (Ap),.
- Centre Nord : Ambohijanahary (Ab), Antsevabe (At) et Didy (Dd)
- Centre : Bekorakaka (Bk), Madiorano (Md) et Ankeniheny (Ak)
- Sud : Ranomafana (Rn) et Tolongoina (T)

3.1. Diversité génétique

A partir des 15 amorces retenues pour la mise en évidence du polymorphisme moléculaire, on a pu révéler 63 locis (marqueurs). Ces derniers ont été retenus compte tenu de la netteté des bandes. Le nombre des bandes (marqueurs) retenues sur chaque amorce est résumé dans le tableau ci- dessous.

Tableau n° 5 : Nombre des bandes retenues par amorce

Amorces	W1	W3	W7	W9	W10	W12	W14	W118
Bandes	1	5	6	4	3	3	2	4
Amorces	X5	B3	B10	B11	B18	B19	B20	
Bandes	7	4	5	6	5	6	2	

3.1.1. Diversité globale des populations

Les résultats de l'analyse factorielle des correspondances multiples décrivent la diversité globale des populations étudiées sous forme de graphique. Cette analyse était effectuée à partir de la matrice de données de 0 et de 1 obtenu par la lecture de photos de gel.

Le graphe n°1 montre la répartition des populations sur les axes 1 et 2 : les trois grands domaines de provenances des populations sont observés. Il s'agit du Nord, du Centre et du Sud. Les populations du Nord et du centre Nord sont formées par les groupes en couleur verte, le Centre en rouge et le Sud en bleu. Les axes factoriels ici représentent mieux la population de Tolongoina (T)

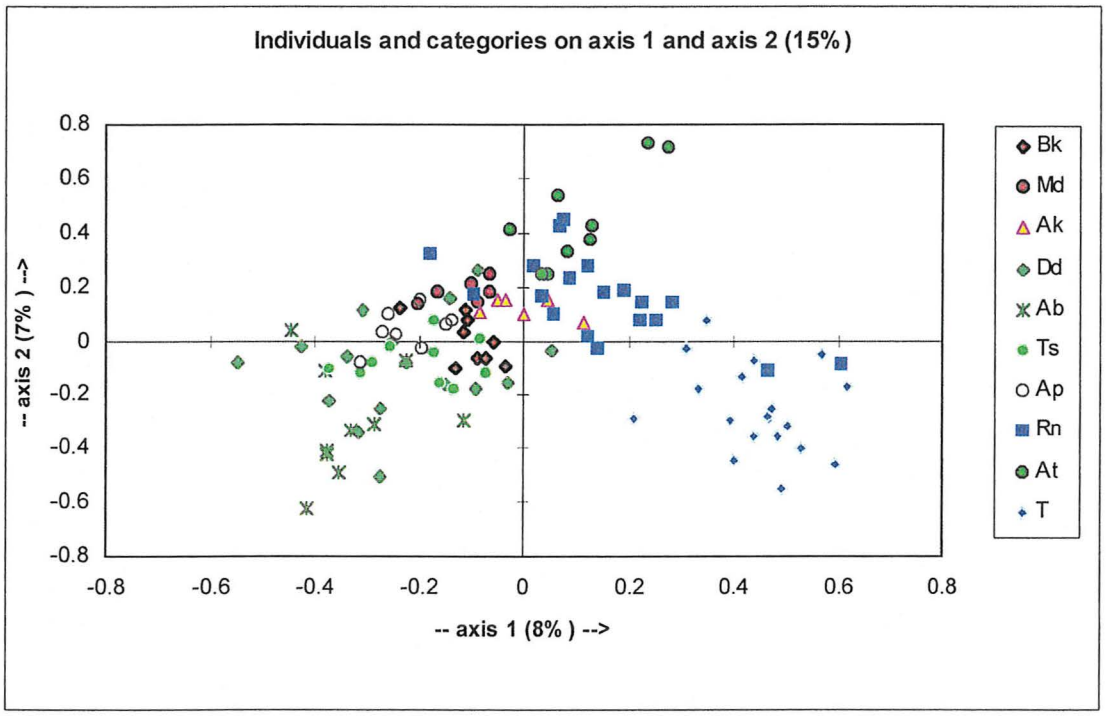
Rapport-Gratuit.com

qui montre une structure bien repartie tandis que les autres populations du (Nord et Centre) sont mélangées.

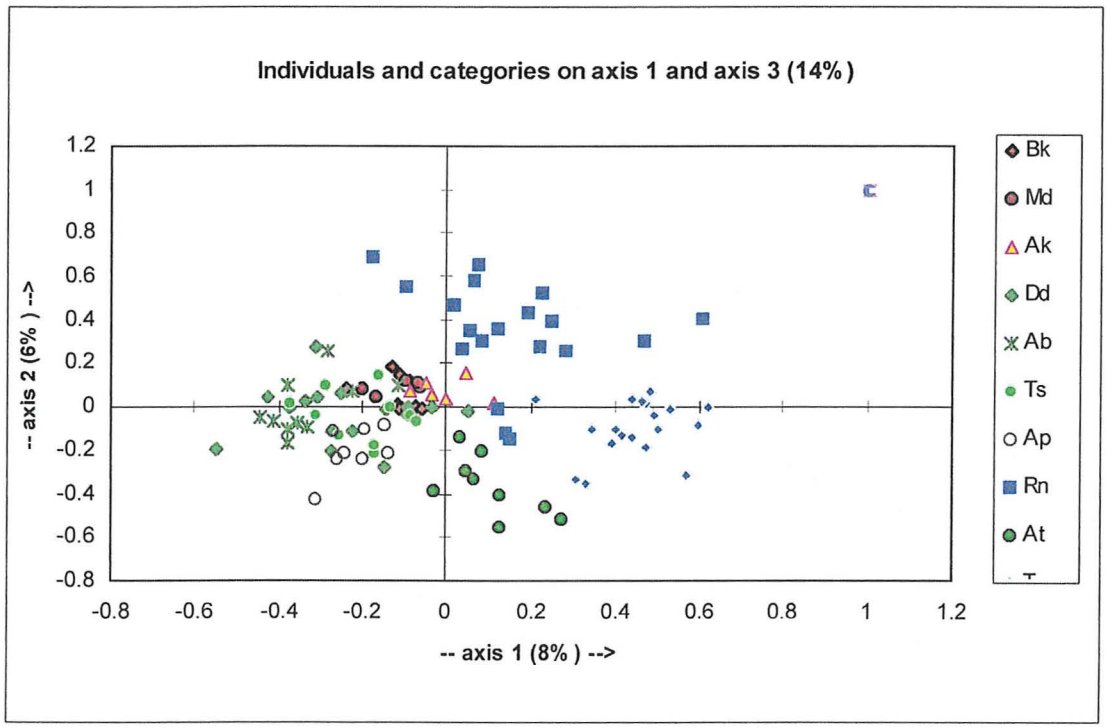
Globalement, la différenciation des populations du Nord vers le sud est constatée ici. On remarque cependant le mélange de la population d'Antsevabe avec celles du Sud en particulier Ranomafana.

Dans le graphique n°2, on peut distinguer facilement les populations du Sud par rapport aux autres domaines. Le mélange des individus dans les groupes du Centre, du Centre Nord et du Nord est toujours constaté. Cela signifie que la caractéristique génétique de ces populations n'est pas très éloignée.

Le graphe n° 3 sous forme d'arborescence confirme le regroupement des populations selon les domaines de provenance. Il est obtenu à partir de la matrice des moyennes de 1 (présence de fragment ou bande) par population. Les populations y sont proches deux à deux sauf la population d'Antsevabe et d'Ankeniheny. Notons que sur le plan géographique, ces populations sont proches. La population d'Antsevabe est toujours rattachée à celles du Sud.

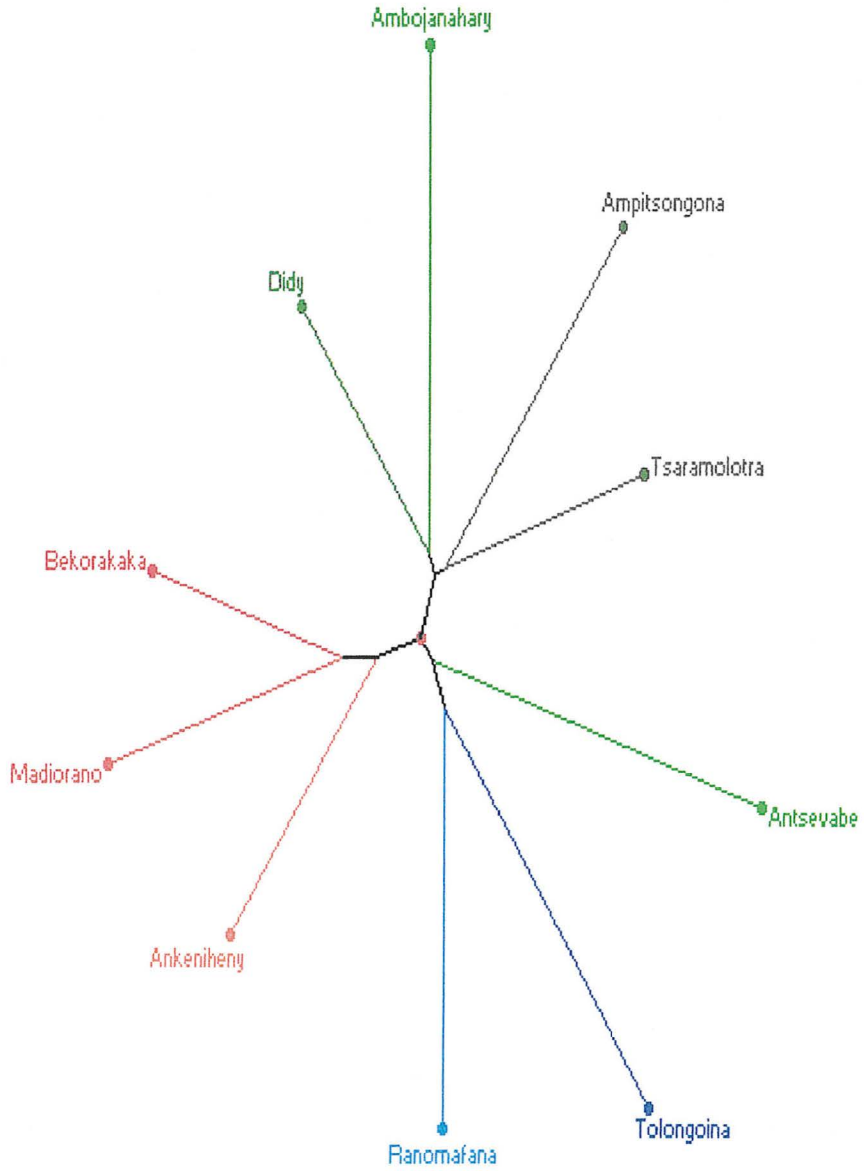


Graphe n°1 : Représentation des résultats d'analyse sur AFCM sur les axes 1 et 2
(Couleur verte : domaine Nord ; Rouge :domaine Centre ; Bleu : domaine Sud)



Graphe n°2 : Représentation des résultats d'analyse sur AFCM sur les axes 1 et 3

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



Graphe n° 3 : Représentation arborée de la répartition des populations étudiées

3.1.2. Relation entre les individus

Les résultats obtenus à partir de l'analyse des données RAPD sur le logiciel Darwin est représenté sous forme d'arborescence. Dans cette analyse, avec l'indice de Sokal et Michener, on constate sur l'arborescence que les individus sont groupés sur trois branches principales (Graphe n°4). Ces dernières ont mis en évidence les trois zones géographiques de provenances des populations : Nord, Centre et Sud. Ce qui correspond aux résultats obtenus par l'AFCM.

Au niveau des branches, les individus de Tolongoina (T) et de Ranomafana (Rn) forment des groupes bien distincts tandis que dans les autres populations les individus sont repartis dans une plus large variabilité. Par exemple les individus de la population de Didy (D1, D2, D3, D5, D7) se repartissent dans différentes grappes comme les individus de Bekorakaka (Bk2, Bk4, Bk5).

La population d'Antsevabe (At) est toujours séparée des populations du Centre Nord qui est sa région géographique. Elle est rattachée avec les groupes du domaine Sud. Des hypothèses sont données dans la partie discussion pour expliquer cette particularité.

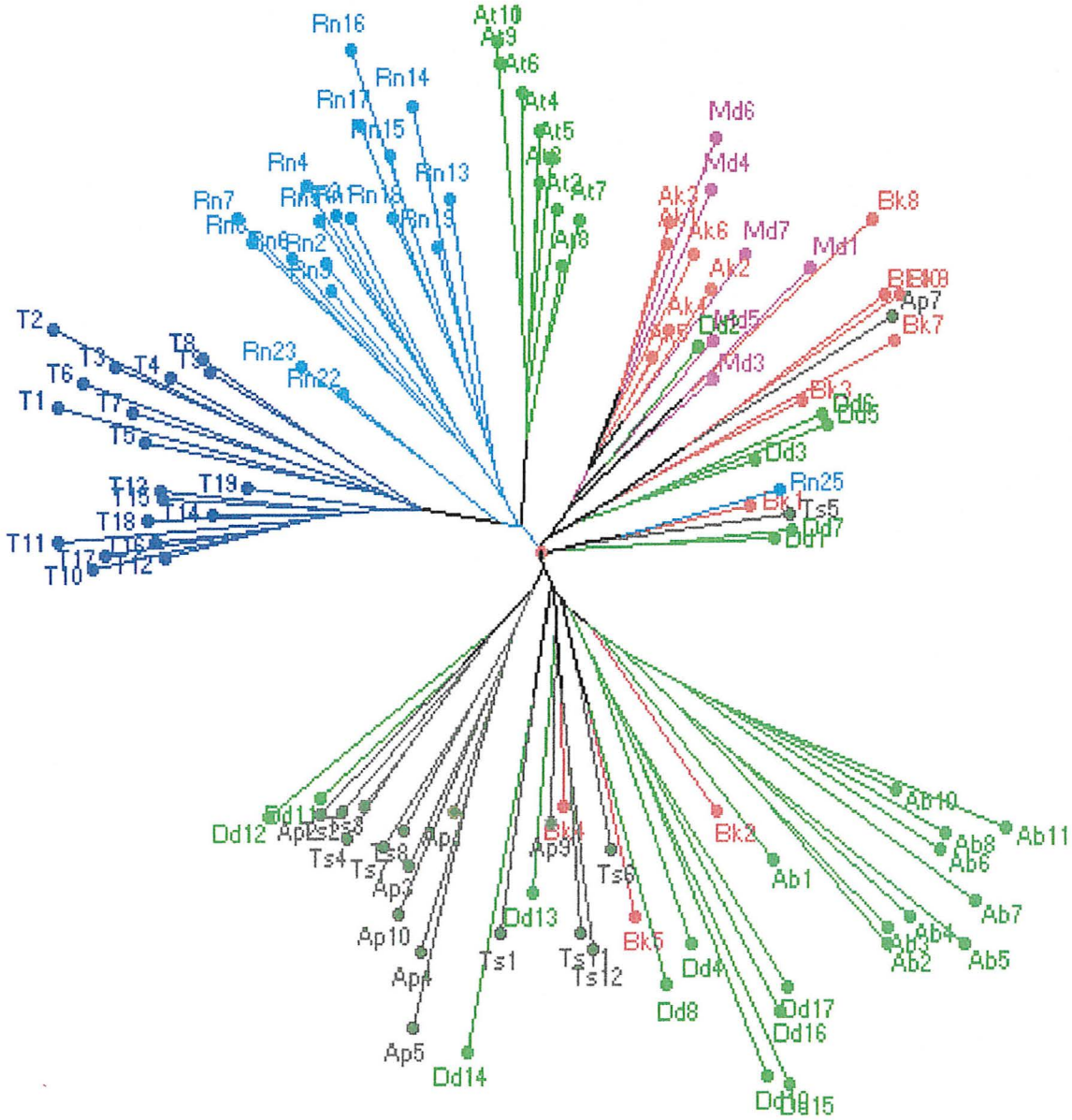
- Au niveau de la distance génétique, la structure de l'arbre indique qu'il y a une grande distance entre les individus de chaque population et une faible distance entre les populations. Cela correspond à une grande variabilité à l'intérieur de chaque population.

3.1.3. Variabilité intra et inter-populations

Les résultats de l'analyse de variance montre que la variance entre les populations n'est pas nulle. Ils sont résumés comme suit :

Tableau 6 : Résultats d'analyse de variance

Source de variation	**ddl**	**Carré moyen**	**Variance**	**%**	
Population	9	29.576	2.073	23.93	$P < 0.0020$
Individu	112	6.592	6.591	76.07	



Graphe n° 4 : Représentation arborée de la répartition des individus

La valeur obtenue pour σ^2A et différente de 0 (2.073) avec probabilité (variance obtenue par randomisation > variance observée) < 0,0020. Cela indique la présence d'une diversité d'origine génétique entre les populations étudiées.

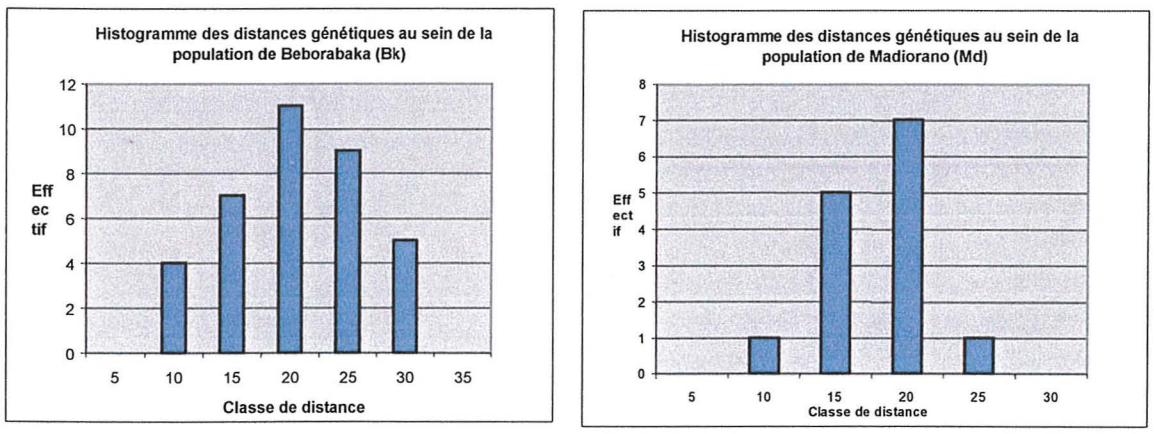
Au niveau des valeurs obtenues sur la variance intra et inter population, les résultats montrent que la variance intra population est supérieure à celle inter population : var (intra) = 76,07 %, var (inter) = 23,96 %. Cela confirme les résultats observés dans les deux premières analyses graphiques.

3.1.4. Distances génétiques intra populations

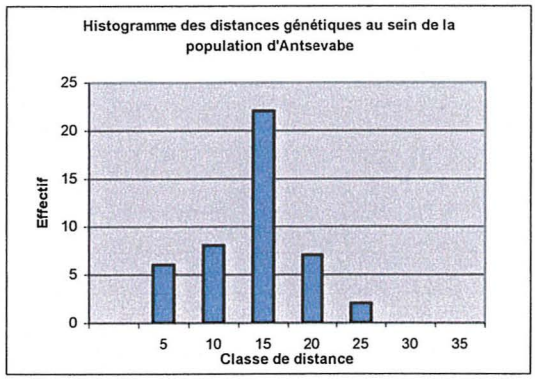
Les résultats sur les distances génétiques (indice de Sokal et Michener) au sein de chaque population sont présentés sous forme d'histogramme (Graphe n°5).

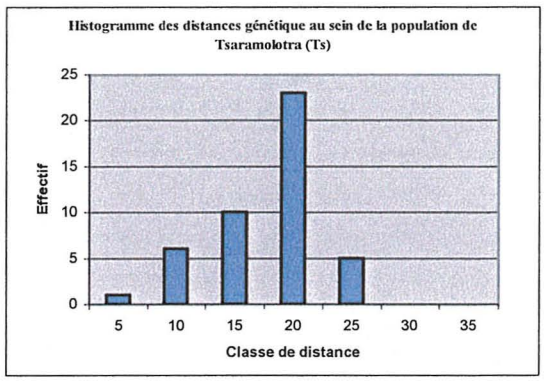
Les populations de Didy et d'Ambohijanahary ont les plus grandes classes de distances génétiques et la majeure partie de ces distances se trouve entre les classes 20 à 35. Les individus y sont plus différents par rapport aux autres populations. Par contre, au sein de la population d'Ankeniheny, les individus apparaissent relativement proches. Pour les autres populations, les classes de distance sont comprises entre 5 à 30 et la distribution se rapproche de la courbe normale.

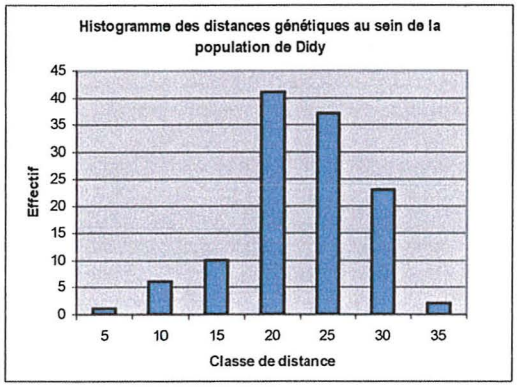
Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence de répartition, il y a par exemple, le nombre des échantillons récoltés qui varie de 6 à 20 individus par population. Concernant le mode d'échantillonnage, la distance entre les individus récoltés se situe entre 30 et 1500 m selon les individus trouvés. Les différents modes d'exploitation de la forêt sont aussi parmi ces facteurs que nous discuterons dans la prochaine partie.

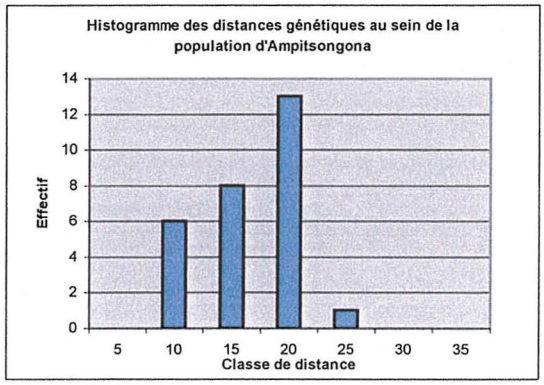


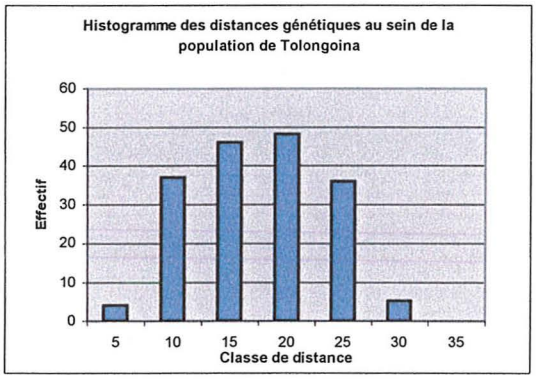
Graphe 5 : Histogramme des distances génétiques intra population

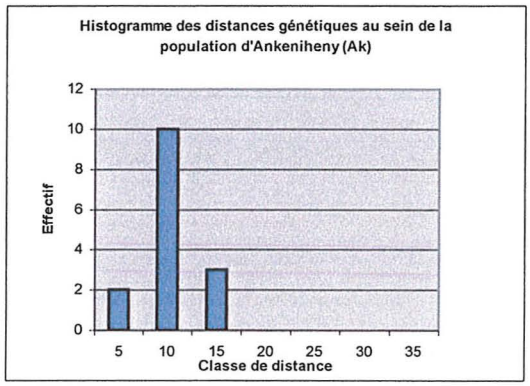


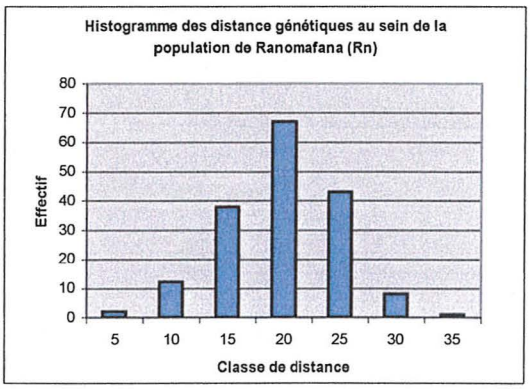


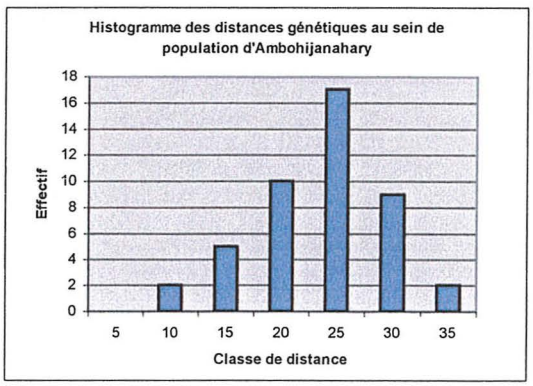












Graphe n°5 : Histogramme des distances génétiques intra population

3.1.5. Corrélation entre les distances géographiques et les distances génétiques

L'étude était effectuée en déterminant la corrélation entre les deux matrices de distances ci-après :

- Matrice de distances géographiques des populations étudiées (km)

	Ts	Ap	Ab	At	Dd	Bk	Md	Ak	RN	T
Ts	0	33	123	155	180	310	326	334	564	625
Ap	33	0	90	122	147	277	293	301	531	592
Ab	123	90	0	32	57	187	203	211	441	502
At	155	122	32	0	25	155	171	179	409	470
Dd	180	147	57	25	0	130	146	154	384	445
Bk	310	277	187	155	130	0	16	24	254	315
Md	326	293	203	171	146	16	0	8	238	299
Ak	334	301	211	179	154	24	8	0	230	291
Rn	564	531	441	409	384	254	238	230	0	61
T	625	592	502	470	445	315	299	291	61	0

- Matrice des distances génétiques des populations étudiées

	Ts	Ap	Ab	At	Dd	Bk	Md	Ak	Rn	T
Ts	0	8.7	10.4	11.2	7.47	8.928	10.4	9.52	10.4	11.7
Ap	8.7	0	12	11.2	9.4	10.5	12.1	11.5	12.8	13.1
Ab	10.4	12	0	13.5	9.96	11.85	13.35	12.9	12.9	13.7
At	11.2	11.2	13.5	0	11.5	12	11.41	11.3	11.9	12.4
Dd	7.47	9.4	9.96	11.5	0	8.75	10.52	9.97	11.2	12.1
Bk	8.928	10.5	11.85	12	8.75	0	7.69	8.99	11.08	12.34
Md	10.4	12.1	13.35	11.41	10.52	7.69	0	8.36	11.44	13.17
Ak	9.52	11.5	12.9	11.3	9.97	8.99	8.36	0	10.6	11.4
Rn	10.4	12.8	12.9	11.9	11.2	11.08	11.44	10.6	0	11.2
T	11.7	13.1	13.7	12.4	12.1	12.34	13.17	11.4	11.2	0

Tsaramolotra (Ts), Ampitsongoina (Ap), Ambohijanahary (Ab), Antsevabe (At), Didy (Dd), Bekorakaka (Bk), Madiorano (Md) et Ankeniheny (Ak), Ranomafana (Rn) et Tolongoina (T)

Le test de Mantel a été effectué avec 1000 permutations. Le coefficient de corrélation C_0 = 0.4552 (probabilité $\cong$ 0) indique la forte corrélation entre la distance géographique et la distance génétique. Ce qui permet de dire que plus les populations sont éloignées physiquement plus elles sont distantes au niveau génétique. Ce résultat confirme donc ce qu'on a obtenu dans les deux premières analyses, c'est-à-dire l'existence de la variation des populations du Nord vers le Sud.

Si on écarte la population d'Antsevabe (At), qui apparaît un peu atypique, la liaison est toujours observée avec l'accroissement de la valeur du coefficient de corrélation C'_0 = 0.5715.

3.1.5. Axes de discussion

Les résultats obtenus ci dessus permettent d'aborder la discussion selon différents axes.

a- Structure des populations

Il n' a pas été possible dans le cadre de ce stage d'aborder de façon plus détaillée l'aspect structuration des populations selon les méthodes classiques de génétique des populations. Il aurait d'ailleurs été nécessaire d'adopter certaines hypothèses sur l'état d'équilibre des populations (hypothèse de l'équilibre de Hardy Weinberg) pour pouvoir calculer les fréquences alléliques avec des marqueurs RAPD (Lynch et Milligan 1994).
Une autre approche aurait été d'utiliser l'indice de diversité de Shanon (Gillies et al., 1997), qui évite certaines hypothèses ; cette approche pourra être programmée dans des analyses ultérieures.

Ceci étant, les résultats obtenus ci-dessus permettent de souligner une certaine différenciation génétique entre les populations. Cette différenciation, mise en évidence par une méthode descriptive (analyse factorielle des correspondances multiples), a été confirmée, par un test statistique par l'analyse de variance, comme ayant un fondement génétique.
La distance génétique différençiant les populations est par ailleurs positivement corrélée à la distance géographique (test de Mantel); il semble donc qu'une des causes de cette différenciation soit due à l'absence d'échange de gènes entre les populations géographiquement très éloignées.
Cependant, même si le coefficient de corrélation issu du test de Mantel est significativement différent de zéro, sa valeur reste moyenne (0.45 avec l'ensemble des populations et 0.57 sans la population At). La diversité entre les populations n'est donc pas totalement expliquée par les distances géographiques. D'autres facteurs peuvent rentrer en jeu, favorisant l' isolement au niveau de chaque région. Il s'agit par exemple la fragmentation des forêts...
Comme le montrent les matrices au paragraphe précédent, au sein de chaque région, on note une distance géographique faible et une distance génétique en moyenne inférieure à celle des éléments inter régions. Cependant pour la région « Centre-Nord » on note des distances génétiques relativement forte dgén(Ab, At)=13.5 et dgén(Dd, At)=11.5. Des études plus précises devront être conduites pour tenter d'expliquer ce phénomène, notamment la particularité de la population At qui paraît atypique (artéfact ou origine particulière de cette population ; elle pourrait être notamment constituée par des individus hybrides.).
Un échantillonnage plus dense pourrait permettre aussi de mieux comprendre la structuration des populations au sein de chaque région et entre les régions. De même, des approches à d'autres

échelles, avec des outils de télédétection ou de photo interprétation, pourraient mettre en évidence les possibilités d'échanges de gènes entre zone forestières.

b- Diversité génétique

La diversité génétique reste importante au sein de chaque population. Ce résultat a été mis en évidence par l'analyse des histogrammes de distances entre les individus au sein des populations, par la construction arborée soulignant les distances entre individus plus importantes que les distances interpopulations et par l'analyse de variance soulignant que 76% de la diversité se situait au sein des populations.

On retrouve donc un résultat assez général pour les populations sauvages d'espèce forestière, (ces résultats sont tout à fait comparables à ceux mis en évidence dans les tests de provenances) soulignant que la différence génétique reste très importante entre les individus.

c- Fragmentation des forêts

La fragmentation des forêts à Madagascar est une réalité qui marque fortement les paysages. Ce phénomène est aujourd'hui souvent abordé par les scientifiques et gestionnaires soucieux de la conservation et la gestion des ressources forestières (Young et Boyle 2000) . Il apparaît donc intéressant de replacer les résultats obtenus dans cette étude par rapport à cette problématique.

La plupart des populations a en effet été échantillonnée dans des forêts fragmentées sauf celles de Tolongoina et de Ranomafana. Cette fragmentation est due à des différentes raisons qui seront évoquées dans la partie 4.

De façon théorique la fragmentation, par la réduction du nombre d'individus participant à la reproduction augmente les effets de dérive génétique au sein des fragments et la limitation de l'échange de gènes entre populations conduit à une perte de diversité génétique intra population, une augmentation de la consanguinité et une augmentation de la différenciation inter-populations.

Dans le cas de la forêt malgache de la côte Est, la fragmentation est relativement récente. Un siècle auparavant, la forêt de la côte Est occupait l'espace sûrement de façon plus continue. Compte tenu de la longueur du temps de renouvellement de la population de *Dalbergia monticola* (un ou deux siècles probablement), il est peu probable que l'on assiste à des phénomènes importants de dérive génétique pouvant fortement différencier les populations sur le pas de temps d'un ou deux siècles.

C'est pour cette raison que, malgré une diversité entre les populations, on observe une faible différence inter population et une grande variabilité intra population résultant d'un flux de gènes en

Rapport-Gratuit.com

milieu fermé avec une population efficace relativement grande (avant la disparition progressive de la forêt sur la zone Est).

d- Marqueurs moléculaires et gestion des ressources génétiques

Les marqueurs moléculaires neutres sont de bons révélateurs de la dynamique des populations selon différentes échelles spatiotemporelles. Dans le cas de cette étude, ils mettent en évidence des différences entre populations géographiquement éloignées qui peuvent s'expliquer par une réduction des échanges de gènes entre celles-ci.
Il est possible que cette différenciation observée sur des marqueurs génétiques neutres recouvre une différenciation sur des gènes codant des caractères « utiles » à la survie de l'espèce ou à la valorisation de cette espèce.
Une méthode pour vérifier cette hypothèse consisterait à réaliser des essais de provenances et à mesurer la variabilité sur des caractères sylvicoles. Ceci étant ce type de méthode est très lourd à mettre en œuvre et le temps nécessaire à la mesure de tel caractère est excessivement long.
Une autre méthode, dont les fondements théoriques sont aujourd'hui publiés, consiste à mesurer des paramètres génétiques sur des caractères quantitatifs en milieu naturel et à coupler cette mesure avec du marquage moléculaire qui permet d'estimer le coefficient de parenté entre les individus. Cette méthode pourra être développée dans ces populations pour mesurer la variabilité inter provenances sur ce type de caractère.

De façon pragmatique aujourd'hui, par principe de précaution, les résultats sur les marqueurs montrent une différenciation génétique entre les populations de palissandre que l'on peut considérer comme indicatrice d'une éventuelle différenciation sur d'autres caractères liés à la capacité adaptative de l'espèce ou à sa qualité sylvicole.

En terme de gestion in situ cela peut impliquer la prise en compte de plusieurs provenances pour la conservation de l'espèce, notamment pour les récoltes de graines et les éventuelles plantations. Les provenances du sud seront plantées au sud, du nord plantées au nord. Ce découpage de provenances sur la base de marqueurs moléculaires, regroupe les zones de provenance à caractère climatique défini : le nord avec une pluviométrie annuelle de 750 à 1250 mm, le centre situé entre 1700 à 2200 et le Sud avec une forte pluviosité près de 3000 mm/ an.

3.2. Facteurs socio-économiques liés à la gestion des ressources génétiques de l'espèce

En général, la forêt contribue à la satisfaction d'un certain nombre de besoin de l'homme : bois, aliments ...Dans le cadre de la conservation et de gestion d'une forêt, plusieurs facteurs entrent en jeu. Dans notre étude, nous avons considéré les facteurs socio-économiques de chaque région ou site d'étude comme un élément de base de gestion des ressources génétiques résiduelles du palissandre à Madagascar, en particulier le *Dalbergia monticola.*

3.2.1. Aspects socio-économiques liés à la gestion des forêts étudiées

D'après les résultats de notre enquête lors de la descente sur le terrain, l'exploitation et l'utilisation des produits de la forêt sont liés à des facteurs socio-économiques locaux, régionaux et nationaux différents :

- L'augmentation des besoins en bois

La population riveraine des forêts visitées utilise le bois de feu pour leur besoin propre. En général, cela n'a pas d'effet remarquable sur la forêt en question car seules les branches de bois morts sont utilisées. D'après l'enquête, c'est au niveau de l'exploitation de la forêt proprement dite que nous avons remarqué des dangers. Le nombre d'exploitants et les surfaces exploitées augmentent. Cela est expliqué par l'augmentation des besoins en bois d'œuvre dans la capitale et pour l'exportation. Le chiffre obtenu au niveau de l'exportation montre un accroissement d'année en année. Pour le port de Toamasina, en 1998, la quantité exportée était de 2170 m3 et en 1999 de 2820 m3 (Rapport de stage de Rija Andriambanona, Caroline Isle et al, 2001).

Concernant l'exploitation, par exemple à Antsevabe (préfecture Ambatondrazaka), il y a un exploitant forestier qui a une surface d'exploitation de 1000 ha. A Andilamena, 7 exploitants sont engagés et leur parcelle d'exploitation varie de 120 à 900 ha.

Concernant les espèces exploitées, le palissandre est la première cible. D'après les exploitants, cette essence est exploitée car le coût de production et de transport sont trop chers, et seul le prix du palissandre sur le marché peut recouvrir ce coût. Andriambohangijatovo (2000) a déjà signalé dans son plan d'aménagement de la forêt classée d'Ambohilero (Ambatondrazaka) l'urgence de la prise de mesure pour sauver le reste de palissandre dans la région. Les autres essences comme *Ocotea spp* ne sont recherchées que lorsque les pieds de palissandre dans le lot d'exploitation est faible. L'écrémage au niveau de la forêt de cette espèce continue et cela conduit à la diminution de sa diversité génétique.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- L'accroissement démographique favorisant la pratique du «Tavy »

La pratique de la culture sur brûlis continue toujours dans toutes les régions où nous avons mené l'étude. Le défrichement de la surface forestière augmente avec l'accroissement de la population paysanne car son économie est basée à l'agriculture. La technique culturale est aussi encore traditionnelle. C'est pourquoi les besoins en terrain de culture sont importants. Ce système de culture est la principale cause de la diminution progressive de la surface forestière malgache. Il conduit à la fragmentation des certains peuplements forestiers. D'où l'effet néfaste sur l'évolution de la diversité génétique des espèces forestières.

Dans la région de Tolongoina où il y a une mise en place du système de gestion participative des forêts par le CAF (Cadre d'Appui Forestier), le tavy est mieux maîtrisé grâce à l'action de sensibilisation et d'intensification de système agricole par le projet LDI (Landscape Developpement Intervention), comme l'application du système de riziculture irrigué (SRI) ….

- La situation des services forestiers

L'administration forestière est marquée par l'insuffisance de moyens matériels et humains. Par conséquent, le travail de suivi et de contrôle des exploitants n'est pas régulier. On remarque parfois le non respect du règlement indiqué dans le permis d'exploitation, par exemple : l'exploitation en dehors du lot, l'abattage des pieds inférieurs au diamètre exploitable et des pieds sélectionnés comme semenciers…. L'absence de contrôle favorise aussi les coupes illicites. Tout cela a des conséquences importantes au niveau de la structure et de la diversité de la ressource génétique de la forêt. Le rôle de service forestier reste très administratif.

- Une gestion participative des forêts.

Un site parmi les dix visités est géré par des communautés villageoises. Il s'agit de la forêt de Malazamasina de Tolongoina. L'exploitation abusive la forêt s'est arrêté depuis la mise en place d'une gestion communautaire. C'est pourquoi nous avons pu voir quelques grands pieds de *Dalbergia monticola* à l'intérieur (plus de 70 cm de diamètre). Le plan de gestion prend en compte la conservation et la production de la forêt. Les espèces et les individus exploitables sont déjà définis dans le plan de gestion. Cela a été réalisé à partir des inventaires préalables. D'après les riverains, la coupe illicite et le défrichement sont contrôlés car chacun est responsable dans la protection de leur ressource.

3.2.2. Impacts sur les ressources génétiques de l'espèce

L'effet mené par ces différents facteurs socio-économiques dans le cas de notre étude est défini à deux niveaux : sur les ressources globales et sur la diversité des populations de l'espèce.

- Au niveau des ressources génétiques globales

Le défrichement par la culture sur brûlis conduit rapidement à la disparition de grandes superficies de forêts. Par conséquent les forêts humides de moyenne altitude de Madagascar sont devenues des peuplements fragmentés peu denses sauf dans les aires protégées. Cette diminution des surfaces forestières correspond à la disparition de certains individus et espèces. Cela implique une perte de diversité génétique au niveau inter et intra spécifique.

- Au niveau de la diversité génétique de l'espèce

Les différentes formes d'exploitation ont toujours des conséquences au niveau de leur diversité génétique. Dans le cas de *Dalbergia monticola*, par écrémage, les individus présentant de bonne forme sont abattus. Cela peut conduire à la disparition de certains groupes d'individus et à une perte de gènes au niveau de la population. L'exploitation systématique des individus les plus grands, les mieux conformés et les plus vigoureux peut éventuellement entraîner une sélection contre la capacité de l'espèce à se régénérer.

3.3. Recommandations et actions à entreprendre pour la gestion des ressources génétiques de Dalbergia monticola

A Madagascar, les ressources génétiques de palissandre en particulier le *Dalbergia monticola* sont très menacées vu les différentes formes d'exploitation liées à des facteurs socio-économiques non négligeables. La conservation et la gestion des ressources génétiques résiduelles ainsi que leur diversité génétique est donc indispensable et urgente. Dans cette mesure de gestion, les résultats de notre étude constituent des éléments de bases pour la mise en œuvre des actions à entreprendre.

➢ Actions de conservation :

- Conservation *in situ*

La conservation *in-situ* est la conservation des écosystèmes et des habitats naturels, et le maintien et la reconstitution de populations viables d'espèces dans leur milieu naturel (Convention sur la biodiversité biologique, 1992). Elle est dynamique car les facteurs évolutifs et l'écosystème de

l'espèce sont observés. Elle est intéressante pour les espèces autochtones à croissance lente, dont notre espèce. Dans la conservation, il faut prendre le maximum de variabilité.

Les études de la diversité génétique sur la base de marqueurs ont montré qu'une différenciation existait entre les populations réparties sur la côte est selon l'axe nord-sud. Si par principe de précaution, on considère que cette différenciation touche l'ensemble du génome de cette espèce, il serait alors avantageux de raisonner la conservation in situ en tenant compte des différentes provenances pour cette espèce.

Il serait aussi intéressant d'analyser le caractère d'espèce modèle de *Dalbergia monticola* et sa représentativité dans les écosystèmes. On pourrait ainsi, pour une première approche appliquer les résultats à un ensemble d'espèce voir à des écosystèmes qui pourraient être englobés dans des zones de conservations : le nord, le centre et le sud.

Il serait par ailleurs nécessaire de poursuivre cette étude en observant les mesures actuelles prises par les responsables en matière d'aires protégées.

Dans la mesure de conservation, la mise en place des parcelles permanentes permettent de suivre l'évolution des ressources.

- Conservation *ex situ*

Dans le contexte malgache, où on assiste à une disparition extrêmement rapide des forêts, il est tout à fait légitime d'évoquer la conservation ex-situ pour des espèces à haute valeur économique.

Cette conservation nécessite la mise au point de techniques sylvicole de base comme la propagation par graines et les techniques de plantation.

Il paraît important que les recherches s'orientent vers ces mises au point techniques

Il est notamment possible d'évoquer la culture in vitro pour la conservation de l'espèce car il est très difficile de trouver des graines actuellement. Cela est dû à l'exploitation des arbres semenciers. La sécurité de la conservation in-vitro est très élevée et le matériel conservé est facilement accessible pour utilisation ou évaluation (Withers, 1993; Maxted et *al,* 1997)

➢ Participation des populations locales

La politique de gestion participative des forêts a été déjà lancée depuis quelques années à Madagascar. Pour certaines régions, elle améliore la gestion des ressources car ces dernières sont protégées comme le cas de Malazamasina Tolongoina. Pour le cas de palissandre, en particulier le *Dalbergia monticola,* la participation des populations riveraines à la protection de l'espèce est très importante, face à la disparition progressive des ressources génétiques de l'espèce. Dans le plan de gestion des ressources, les actions de conservation, d'enrichissement et de restauration doivent être

bien définies pour l'espèce. Cela demande une formation pour les collectivités locales sur les différentes techniques nécessaires comme la technique de récolte des graines, de reproduction et de plantation de l'espèce.

Mais pour mieux maîtriser la gestion, des études doivent être faite aussi sur la techniques de multiplication et la sylviculture de l'espèce. Cela peut se faire en effectuant des études sur la germination des graines, la multiplication des plants en pépinière, l'essai d'enrichissement et de plantation…

4. CONCLUSIONS

Le palissandre, en particulier le *Dalbergia monticola* est parmi les espèces forestières les plus recherchées à Madagascar en tant que bois d'œuvre et d'ébénisterie. Le volume d'exportation a montré aussi qu'il est aussi très demandé à l'extérieur. Cela entraîne la surexploitation de l'espèce et conduit progressivement à sa disparition.

Dans le cadre de la gestion durable de l'espèce, cette étude a donc été menée pour mettre en évidence des éléments de base de gestion des ressources génétiques résiduelles. Pour cela des études sur la diversité génétique et sur les facteurs socio-économiques ont été effectuées pour avoir des informations sur la structure des populations restantes et les aspects socio-économiques liés à sa gestion future.

En utilisant la technique de marquage moléculaire RAPD qui présente des avantages sur la rapidité de sa mise en œuvre dans l'étude de la variabilité génétique de l'espèce, les résultats aboutissent à la distinction progressive des populations entre le nord et le sud et soulignent l'importante variabilité à l'intérieur des populations.

Les différentes formes d'exploitation des forêts qui mènent à la fragmentation et au changement de la structure des forêts sont liées des facteurs socio-économiques locaux, régionaux et nationaux. Ces derniers sont définis comme l'augmentation des besoins en bois, l'accroissement démographique favorisant la pratique du "Tavy", le manque de contrôle par l'administration forestière. La mise en place de la gestion participative dans le cas de forêt de Malazamasina Tolongoina était considérée comme un facteur positif.

Dans le cadre de la conservation et la gestion des ressources génétiques de cette espèce, des actions sont à entreprendre :

- conservation *in situ* des populations selon trois grandes régions en s'appuyant sur les mesures de conservations déjà entreprises.
- conservation *ex situ* en complément de l'approche in situ et pour mieux valoriser cette espèce si elle doit être plantée,

- faire participer les populations riveraines dans les actions à entreprendre sur la gestion des ressources en diffusant l'information sur les techniques de conservation, de multiplication, d'enrichissement de la forêt

En matière de recherche d'autres actions sont à envisager dans le futur pour mieux gérer l'espèce :

- poursuite de l'analyse de la structuration des populations au niveau de son aire naturelle avec d'autres types de marqueurs tels que les marqueurs chloroplastiques qui permettent de retracer l'historique des flux de gènes par graines sur des échelles spatio temporelles importantes,
- analyse de la dynamique au niveau local ; démographie et flux de gènes au sein des forêts pour étudier et comprendre les flux de gènes et la régénération de l'espèce.
- étude sur les techniques de multiplication de l'espèce afin de les vulgariser au niveau des riverains,
- amélioration de la connaissance sur la sylviculture et la phénologie de l'espèce.

BIBLIOGRAPHIE

- **ARNOLD U. et ANDRIANAIVO O (2000),** Gestion des ressources phytogénétiques forestières : études axées sur *Dalbergia baronii, Dalbergia greveana, Dalbergia monticola et Dalbergia perrieri* – Rapport de stage 2000, 102 p

- **AYAD W. G. *et al* (1995),** The analysis of RAPD data – In : Molecular genetic techniques for plant genetic resources, pp : 68 –73. Report of an IPGRI Workshop. Rome, Italy.

- **BOSSER J. et RABEVOHITRA R. (1996),** Synopsis des légumineuses de Madagascar - Laboratoire de Phanérogamie, Muséum, Paris France et DRFP/FOFIFA Tananarive, Madagascar, p 65.

- **BOSSER J. et RABEVOHITRA R. (1996),** Taxa et noms nouveaux dans le genre *Dalbergia* à Madagascar – Bull. Mus. Hist., Paris, 4^{e} série, 18, 1996, section B, n°3-4 , p : 171-212.

- **BRYAN F. J. MANLY (1991),** Randomisation, bootstrap and monte carlo methods in biology - Test in statistical Science – University of Otago, New Zealand. Second edition 1997. 399 p

- **CHALMERS K. J. (1992),** Detection of genetic variation between and within populations of Gliricidia sepium and G. maculata using RAPD markers. In : Heredity, 69 (1992), pp 465 – 472.

- **CHARBONNIER B. (1998),** Limites et dynamique coutumière dans la forêt classée d'Ambohilero, à l'intérieur de la cuvette de Didy, S.E d'Ambatondrazaka. – Mémoire, Mastère en Foresterie Rurale Tropicale. ENGREF – CIRAD – Forêt, p 90.

- **CHEVALLIER M. H. (1998),** Les marqueurs moléculaires – In : Vers une approche régionale des ressources génétiques forestières en Afrique subsaharienne, pp : 130 – 136 , Burkina Faso – IPGRI.

- **DERVIN C. (1992),** Comment intérpréter les résultats d'une analyse factorielle des correspondances – Collection STAT – ITCF – Edition 1992

- **GRIVET L. et NOYER J. L. (1999),** Les méthodes de marquage biochimique et moléculaire – In : Diversité génétique des plantes tropicales cultivées – Montpellier : CIRAD 1999. pp 13-41.

- **ISLE DE BEAUCHAINE C. , ANDRIAMBANONA R. *et al* (2001)** Etude de la filière *Dalbergia* (palissandre) à Madagascar. Tome I : étude socio-économique de la filière - Rapport de stage 2001, p 73.

- **KJAER E. et GRAUDAL L. (1998),** Stratégie et méthode de conservation des ressources génétiques forestières – In : Vers une approche régionale des ressources génétiques forestières en Afrique subsaharienne, pp : 261 – 278 , Burkina Faso – IPGRI.

- **LYNCH M. and MILLIGAN B. G. (1994),** Analys of population genetic structure with RAPD markers – In : Molecular Ecology , pp 91-99

- **MEF/ SNGF (2000),** Plan National Stratégique de Gestion des Réssources Phytogénétiques Forestières – MEF/ SNGF, MINEV / ONE, MRS/ FOFIFA, p 23.

- **MEF/** Programme Dette Nature, Plan d'Aménagement – Forêt Malazamasina Tolongoina, 1998 – Projet CAF / APN, 25 p.

- **NASON J. D. and HAMRICK J. L (1996),** Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation : two case studies of neotropical canopy trees – In : Journal of Heredity 88 , p 264 – 278.

- **PACAULT I. (1999),** Etude de la diversité génétique chez Santalum austrocaledonicum de Nouvelle Calédonie par la technique random amplified polymorphic DNA – Université Montpellier II , 17 p.

- **PELTIER D. *et al* (1994),** Utilisation des RAPD pour la construction de phénogrammes et de phylogrammes chez *Petunia* – In : Techniques et utilisation des marqueurs moléculaires, Montpellier – Edition INRA, Paris (Les colloques n° 72), pp 188 – 200.

- **PERRIER X. (1998),** Analyse de la diversité génétique : mesures de dissimilarité et représentations arborées –-Thèse de Doctorat , Université Montpellier II, 181 p.

- **PERRIER X. *et al* (1999),** Les méthodes d'analyse des données – In : Diversité génétique des plantes tropicales cultivées, CIRAD colloque , 1999. pp 43 – 75.

- **RANDRIAMBOHANGINJATOVO (2000),** Schema d'aménagement de la forêt classée d'Ambohilero – DIREF Toamasina / CEF Ambatondrazaka. pp 3 – 37.

- **STEPHANIE A. Forré *et al* (1991),** Genetic structure after forest fragmentation : a landscape ecology perspective on *Acer saccharum.* Pp 1659 -1668

- **YOUNG A. et al (1998),** Forest fragmentation – In : Forest conservation genetics, p 123 – 134.

Rapport-Gratuit.com

ANNEXES

Annexe 1 : Extrait du Plan National Stratégique de Gestion des Ressources Phytogénétiques forestières

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Annexe 2 : Caractéristiques des individus par population

Provenance	n° éch	H tot (m)	D1.30 (cm)	Fût	Dist (m)	Sol	Topographie	Remarque
Bekorakaka (Bk)	1	12	27	2		Sab hum	Versant	
	2	8	18	3	50			
	3	6	10	1	1000		Bas du V	
	4	3	5	2	50			Régénérat°
	5	10	22	1	500		Versant	
	7	15	26	1	1000		Bas fond	
	8	9	20	2	500		Versant	
	9	9	20	1	500		Haut du V	
	10	8	21	1	50			
Madiorano (Md)	1	15	30	1		S-L hum	Sommet V	
	2	8	15	2	1500		Versant	
	3	14	24	1	200			
	4	16	20	1	100			
	5	16	22	2	300		Haut du V	
	6	13	23	1	500		Sommet V	
	7	9	16	2	1000		Versant	
Ankeniheny (Ak)	1	10	14	1		S-hum	Versant	
	2	14	19	1	500		Haut du V	
	3	14	20	1	500		Versant	
	4	12	26	3	100			
	5	8	11	1	200			
	6	9	14	2	500			
Didy(Dd)	1	16	45	2		A - S	V à p faible	.
	2	2	5	1	30			Régénérat°.
	3	8	18	2	50			.
	4	10	23	2	50			.
	5	5	12	2	30			.
	6	4		2	20			.
	7	9	18	3	50			.
	8	13	20	1	50			.
	10	14	26	2	50		Sommet V	.
	11	6	12	1	20			.
	12	2	3	1	30			Régénérat°.
	13	10	16	1	30			.
	14	13	35	2	50			.
	15	9	16	1	40			.
	16	3	5	3	40		Rejet de sc	.
	17	10	18		50			.

Provenance	n° éch	H tot (m)	D1.30 (cm)	Fût	Dist (m)	Sol	Topographie	Remarque
Antsevabe (At)	2	15	28	1	20			
	3	15	34	2	30			.
	4	14	18 / 24	2	30		Sommet V	.
	5	7	14	1	30			
	6	3	6	3	40			Rejet de sc
	7	2	3	2	100			Rejet de sc
	8	10	14	2	50		Versant	.
	9	6	14	2	40	A-Lhum		.
	10	7	16	1	40			.
	11	5	8	1	20			.
Ampitsongona (Ap)	1	7	8	2		A – S peu humifié	Versant	long folioles.
	2	15	28	1	50			.
	3	1	< 2		50			Rejet de sc.
	4	4	5	1	50			Régénérat°
	5	2	2	2	50			long folioles
	7	7	16	2	500			.
	9	1	< 2		500			Régénérat°
	10	1	< 2		200			Régénérat°
Tsaramolotra (Ts)	1	1.5	25			A-S hum	Versant	Rejet de sc (ptt petiolul
	2	O.5	< 2		500			Rejet de sc (long foliole
	3	10	30	3	50			.
	4	8	14	2	100			.
	5	10	14	1	100			.
	6	6	16	2	50			.
	7	10	35	3	100			.
	8	12	18	1	50			.
	11	6	12	2	100			.
	12	5	3	2	50			.
Ambohijanaha (Ab)	1	7	16	2		Argileux	Haut du V	
	2	5	7	1	200			Régénérat°.
	3	20	70	2	100			
	4	6	14/16	3	300	A Shum	Bas du V	.
	5	6	14	3	50			Régénérat°
	6	7	7	1	100			
	7	8	14	1	50			
	8	8	18	2	100			
	10	22	60 / 50	2	100	A S	Versant	
	11	10	20	1	1500			

Provenance	n° éch	H tot (m)	D1.30 (cm)	Fût	Dist (m)	Sol	Topographie	Remarque
Ranomafana (Rn)	1	11	22	2		A-S hum	Haut du V	.
	2	6	8	3	50	-..-	-	.
	3	16	25	2	50	-..-		
	4	6	5	1	40	-..-		Régénérat°
	5	4	4	2	50	-..-		Régénérat°
	6	18	17*3	2	70	-..-		
	7	6	8*3	2	20	-..-	Versant	.
	8	11	15	2	30	-..-		.
	9	13	26	1	20			.
	13	5	5	1	50			Régénérat°.
	14	6	6	1	30			Régénérat°.
	15	7	14	1	50			.
	16	6	12	1	50			.
	17	8	7	1	100			.
	18	3	4	2	30			Régénérat°.
	19	10	25	3	50			.
	22	4	10	2	50			.
	23	1.2	5	3	20			Plantation (4 ans) .
	25	14	16	1	200			.
Tolongoina (T) Malazamasina	1	1	< 2	1		L-S hum		Régénérat°
	2	2	< 2	1	30			Régénérat°
	3	2	< 2	1	20			Régénérat°
	4	9	13	2	50			.
	5	6	9	1	100			.
	6	2	3	1	30			Régénérat°
	7	6	8	2	100			.
	8	4	8	2	100			.
	9	2	< 2	2	50			Régénérat°
	10	3	3	1	50			Régénérat°
	11	4	12	2	70			.
	12	3	5	2	50			Régénérat°
	13	8	14	1	200			.
	14	5	8	2	300			.
	15	8	20	2	50			.
	16	20	70	2	50			.
	17	4	5	1	500			.
	18	3	<2	1	50			Régénérat°
	19	7	10	2	1000			.
	20	3	3	2	500			Régénérat°

V : versant; sc : souche; A : argileux; S : sableux; hum : humifié; L : limoneux

Pétiol : pétiolule

Foliol : folioles

Annexe 3 : Formulaire d'enquête

Formulaire d'enquête

Nom :

Profession :

Lieu :

Date :

Concernant la forêt :

- A qui appartient la forêt?
- A quoi vous sert la forêt?
- Quels sont les produits que vous pouvez y trouver ?
- Quels sont les types de bois les plus exploités?

Utilisation

- Est ce que vous connaissez le palissandre?
- Quelles sont les espèces qui existent dans votre région?
- Utilisez vous du palissandre? Pourquoi faire?
- Quels sont les différents types d'utilisation (bois, feuilles, écorce ...)?
- Quels sont la forme et la qualité de bois qu'on exploite le plus?

Exploitation

- Qui exploitent le palissandre dans votre région?
- D'où viennent les exploitants?
- Est ce qu'ils sont légals?
- Quelle est la forme d'exploitation (produits transportés)? En particulier le palissandre?
- Où vont les produits?

Conservation

- Quelles sont les dangers pour le palissandre?
- Y-a-t-il de problèmes à la protection?
- Pensez vous à la plantation du palissandre?

Annexe 4 : Technique d'extraction d'ADN

Méthode de Shaghai Maroof et al (1984), Gawel et Jarret (1991)

1. Extraction / Deprotéinisation :

- prévoir la quantité nécessaire de tampon d'extraction en fonction du nombre d'échantillon : 1.3 ml de tampon / échantillon
  ajouter au tampon d'extraction ATMAB (stérile) :
  0.1 % mercaptoéthanol + 1 % polyvinylpyrrolidone
- préchauffer le tampon au bain-marie à 65°C
- broyer 100 mg de matériel végétal dans un grand mortier en présence d'azote liquide.
- introduire la poudre obtenue dans un tube Eppendorf de 2 ml stérile numéroté.
- verser 650 µl de tampon chaud sur la poudre, mélanger doucement, puis rajouter 650 µl de tampon. Homogénéiser.
- placer dans le tube au bain-marie 65°C
- sortir les tubes, les laisser refroidir (sinon ça va mousser à l'étape suivante !)°. Ajouter 400 µl de dichlorométhane mélanger doucement pendant 10 mn.
- centrifuger 10 mn à 6000T/mn (SIGMA 3-5). Si nécessaire recentrifuger à nouveau.
- prélever le surnageant (pipetman P1000 + cône stérile) et le déposer dans un tube Eppendorf de 1.5 ml. Ajouter 400 µl de dichlorométhane, mélanger pendant 10 mn.
- centrifuger 10 mn à 6000 T/mn soit 3000 x g
- prélever le surnageant et le déposer dans un nouveau tube stérile de 1.5

2. Précipitation de l'ADN

- sortir les tubes, les laisser refroidir. Ajouter 500 µl d'isopropanol froid (congélateur –20°C) + 7 µl de NaCL 5M
- placer les tubes à –20°C au moins 1 heure voir une nuit à 4°C
- centrifuger 10 mn à 6000T/mn soit 3000 x g.
- éliminer le surnageant au-dessus d'un petit bêcher en vérifiant que la pelote d'ADN ne soit pas entraînée. Egoutter les tubes en les inclinant à 30° sur un papier absorbant. Vérifier que les culots ne glissent pas.

3. Purification : Reprise de l'ADN :

- rincer les culots avec 500 µl d'éthanol à 70° par douce inversion des tubes.
- centrifuger 10 mn à 6000 T/mn
- éliminer le surnageant comme précédemment. Sécher sous vide au speed-vac 30 mn maxi à 40°C (position médium de l'appareil) ;
- reprendre d'ADN dans 100 µl d'eau stérile à 65°C (bain-marie) ; si le culot d'ADN est important, le reprendre dans 200 à 500 µl d'eau. Stocker à –20°C.

Annexe 5 : Exemple des résultats d'analyse de variance

Thursday 9/20/2001 15h36'

```
                    ANALYSIS OF MOLECULAR VARIANCE
                    ==============================

Input files
===========

 Distance Matrix File          : D:\MESDON~1\LIVA\AMOVA\PALI1D.DIS
 Group File                    : D:\MESDON~1\LIVA\AMOVA\PALIG.GRP
 Population File generic name  : palip

 No. of Groups      :     1
 No. of Populations :    10
 No. of Chromosomes :   113
 No. of Haplotypes  :   112

Sum of squares
==============

               SS(A) =     422.5126
               SS(B) =    1077.6700
               ====================
           SS(Total) =    1500.1826

Within Population sums of squares
=================================
 (Population    1)      90.2998
 (Population    2)      50.0000
 (Population    3)      31.4815
 (Population    4)     186.8056
 (Population    5)     114.1270
 (Population    6)      90.1587
 (Population    7)      65.6746
 (Population    8)     197.4937
 (Population    9)      73.0159
 (Population   10)     178.6132


Within Group sums of squares
============================

 (Group    1)    1500.1826


Mean squares
============

 d.f.(A) =     9    MS(A) =   46.946
 d.f.(B) =   103    MS(B) =   10.463
           =====
 Total       112

Variance components
===================

 Variance among populations                V(A) :        3.29104539620
(23.93%)
 Variance within populations               V(B) :       10.46281540100
(76.07%)
 PHI-statistics :   PHIst =  0.239
```

Bartlett's heteroscedasticity index :
==========

Variance heterogeneity among populations : Bp = 1.30139 (Chi square, d.l.=9)

Distances among populations
==========

Distances = PhiST between pairs of populations

Above diagonal : Probability Random distance (PhiST) > Observed distance
Nb. of iterations : 500

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0000	0.4271	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0519	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1479	0.0760	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0921	0.1372	0.1996	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.2184	0.2781	0.3424	0.1627	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1294	0.1863	0.2703	0.0534	0.1984	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1707	0.2286	0.3448	0.1118	0.2966	0.1545	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1531	0.1646	0.2042	0.1659	0.2665	0.1811	0.2551	0.0000	0.0000	0.0000
0.3198	0.2893	0.3858	0.2706	0.3913	0.3289	0.3236	0.2374	0.0000	0.0000
0.2704	0.3261	0.3489	0.2540	0.3253	0.2824	0.3456	0.2262	0.3521	0.0000

Distances = Modified Coancestry coefficient (-ln[1-PhiST]=t/2N) between pairs of populations

Above diagonal : Probability Random distance (PhiST) > Observed distance
Nb. of iterations : 500

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0000	0.4271	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0533	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1601	0.0790	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0967	0.1476	0.2227	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.2464	0.3259	0.4192	0.1776	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1385	0.2062	0.3151	0.0549	0.2212	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1872	0.2595	0.4228	0.1186	0.3518	0.1678	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1661	0.1798	0.2284	0.1814	0.3099	0.1998	0.2945	0.0000	0.0000	0.0000
0.3853	0.3415	0.4874	0.3156	0.4964	0.3988	0.3909	0.2710	0.0000	0.0000
0.3153	0.3946	0.4291	0.2931	0.3935	0.3318	0.4241	0.2564	0.4340	0.0000

Pairwise Bartlett Tests
==========

Below diagonal : Pairwise Bartlett's Statistics
Above diagonal : Probability Random Bartlett's Statistics > Observed Statistics
Nb. of iterations : 500

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1.2437	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2.3740	1.5065	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1.9990	2.1849	3.4692	0.0000	0.0000	0.1956	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3.1470	3.2600	4.5661	3.0361	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Papier-Gratuit.com

2.1545	2.2996	3.4019	1.6913	3.1287	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2.4205	2.4933	3.7971	2.2856	4.0736	2.2922	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2.8901	2.4804	3.4176	4.1193	5.0664	3.5132	4.2724	0.0000	0.0000	0.0000
4.6845	3.3627	4.5283	5.2627	6.3127	4.9297	4.3086	4.7142	0.0000	0.0000
4.8294	4.5400	5.2417	6.2976	6.3848	5.3158	5.8300	5.9019	6.9197	0.0000

Variance Components Significance
==========

No. of permutations : 500

	P(More extreme random value)	No. of different values in distribution
VarA and PhiST :	<0.0020	78

Bartlett'statistics significance
==========

Prob(Random Population Heteroscedasticity > Observed Heteroscedasticity) < 0.001996

Tuesday 10/ 2/2001 12h10'

ANALYSIS OF MOLECULAR VARIANCE

Input files

Distance Matrix File : D:\MESDON~1\LIVA\AMOVA\PALID.DIS
Group File : D:\MESDON~1\LIVA\AMOVA\PALIG.GRP
Population File generic name : palip

No. of Groups : 1
No. of Populations : 10
No. of Chromosomes : 113
No. of Haplotypes : 112

Sum of squares

SS(A) = 266.1830
SS(B) = 678.9321
SS(Total) = 945.1150

Within Population sums of squares

(Population 1) 56.8889
(Population 2) 31.5000
(Population 3) 19.8333
(Population 4) 117.6875
(Population 5) 71.9000
(Population 6) 56.8000
(Population 7) 41.3750
(Population 8) 124.4211
(Population 9) 46.0000
(Population 10) 112.5263

Within Group sums of squares

(Group 1) 945.1150

Mean squares

d.f.(A) = 9 MS(A) = 29.576
d.f.(B) = 103 MS(B) = 6.592
Total 112

Variance components

Variance among populations V(A) : 2.07335846270 (23.93%)
Variance within populations V(B) : 6.59157369560 (76.07%)

PHI-statistics : PHIst = 0.239

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Bartlett's heteroscedasticity index :
==========

Variance heterogeneity among populations : Bp = 1.30139 (Chi square, d.l.=9)

Distances among populations
==========

Distances = PhiST between pairs of populations

Above diagonal : Probability Random distance (PhiST) > Observed distance
Nb. of iterations : 500

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0519	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1479	0.0760	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0921	0.1372	0.1996	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.2184	0.2781	0.3424	0.1627	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1294	0.1863	0.2703	0.0534	0.1984	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1707	0.2286	0.3448	0.1118	0.2966	0.1545	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1531	0.1646	0.2042	0.1659	0.2665	0.1811	0.2551	0.0000	0.0000	0.0000
0.3198	0.2893	0.3858	0.2706	0.3913	0.3289	0.3236	0.2374	0.0000	0.0000
0.2704	0.3261	0.3489	0.2540	0.3253	0.2824	0.3456	0.2262	0.3521	0.0000

Distances = Modified Coancestry coefficient (-ln[1-PhiST]=t/2N) between pairs of populations

Above diagonal : Probability Random distance (PhiST) > Observed distance
Nb. of iterations : 500

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0533	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1601	0.0790	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0967	0.1476	0.2227	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.2464	0.3259	0.4192	0.1776	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1385	0.2062	0.3151	0.0549	0.2212	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1872	0.2595	0.4228	0.1186	0.3518	0.1678	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.1661	0.1798	0.2284	0.1814	0.3099	0.1998	0.2945	0.0000	0.0000	0.0000
0.3853	0.3415	0.4874	0.3156	0.4964	0.3988	0.3909	0.2710	0.0000	0.0000
0.3153	0.3946	0.4291	0.2931	0.3935	0.3318	0.4241	0.2564	0.4340	0.0000

SUMMARY

Many species of malagasy palissandre, as known as Dalbergia spp, are highly purchased for wood supply in national and international trade. So, some species are very exploited. Actually, *Dalbergia monticola* is classified as threaten palissandre species because of over harvesting. The productivity and wood quality of this species are very interesting as compared to the other palissandre species.

This research had done to set up the data bases for the short, medium and large term management of the residual genetics resources of *Dalbergia monticola.* It contains some informations about the structure of the populations existing, and the socio-economic aspects which are linked to the species management. That is obtained by the knowledge of their genetic diversity and socio-economic factors.

In the ten populations of *Dalbergia monticola* sampled from their natural habitat, the analysis of genetic diversity using molecular markers proves the existence of genetic variability of the populations from the Northern region into the Southern region. The results of variance analysis demonstrate that the diversity within population is important (76.07 %) than among population (23.93). Considering the genetic characteristics of the three studies regions (North, Center and South) the North and the Center populations are nearer.

In the residual genetics resources, the use and the exploitation of this species are linked to local, regional and national socio-economics factors. The most important of this factors are the increasing of wood needs in the local and international markets, population growth favouring the practice of "Tavy", and the lack of control done by the forest administration because of lack of means. In opposite, the positive interest of local population to protect forest is observed.

In the future management of genetic resources of *Dalbergia monticola*, *in situ* and *ex situ* conservation of the genetic variability according to the three analysed regions are recommended. Also, it requires to strengthen the local people in the peripheral zone to participate on the protection and management of resources giving them some training on technique of collect seeds, multiplication methods of the species ....

For the better management of genetic resources of this species, we still need to continue some researches in multiplication technique, sylviculture, phenology and reinforcement of genetic structure analysis of populations.

Keywords : conservation, *Dalbergia monticola*, genetic diversity, genetic resources, molecular markers, RAPDs