

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de
Montpellier

Ecole Doctorale de l'Université de Montpellier II : **Biologie Intégrative**

Formation doctorale : **Biologie, diversité, adaptation des plantes cultivées**

**Etude des flux de gènes dans un verger à graines
d'*Eucalyptus grandis* à Madagascar**

Présentée et soutenue publiquement par

CHAIX Gilles

Le 18 décembre 2002 à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier

JURY

Mr. Charrier André	Professeur ENSAM	Président
Mr. Lefèvre François	Chargé de Recherche INRA	Rapporteur
Mme Frascaria-Lacoste Nathalie	Maître de conférence ENGREF	Rapporteur
Mr. Hamon Serge	Directeur de Recherche IRD	Directeur de thèse
Mme Gerber-Danjon Sophie	Chargée de recherche INRA	Examinateur
Mr. Mc Key Doyle	Professeur Montpellier II	Examinateur

Remerciements

Les travaux présentés dans ce document se sont déroulés à Madagascar sur les stations d'Antsirinala et de Mahela et à Montpellier au Cirad-forêt à Baillarguet. Ils sont le fruit de la collaboration entre le Centre National de Recherche Agronomique pour le Développement Rural (FOFIFA) et le Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le développement - Département Forêt (Cirad-forêt) et financés, en partie, par l'Action Thématique Programmée (ATP) Vergers à graines 98/20.

Mes premiers remerciements sont adressés au Directeur Général du FOFIFA, M. Rasolo François, au Directeur Scientifique du FOFIFA, Mme Rabenantoandro Yvonne, au Directeur du Cirad-forêt, M. Valeix Jacques et M. Charrier André, responsable de l'Ecole Doctorale « Biologie Intégrative » de l'Université de Montpellier II et Professeur de l'Ecole National Supérieure d'Agronomie de Montpellier, qui m'ont accordé la possibilité de réaliser ces travaux.

Que les membres du jury soient ici remerciés, particulièrement les deux rapporteurs de cette thèse Mme Frascaria-Lacoste Nathalie et M. Lefèvre François, pour avoir consacré une partie de leur temps à la lecture et à l'analyse de ce document. Merci également aux personnes ayant participé aux comités de thèse qui ont permis d'orienter efficacement ce travail : Mme Joly Hélène, MM. Vaissière Bernard, Verhaegen Daniel, Torregrossa Jean Paul et ceux cités par ailleurs.

Je voudrais également remercier le Chef du FOFIFA-DRFP (Départements de Recherches Forestières et Piscicoles) M. Randrianjafy Honoré, le Directeur Général Adjoint de la Fanalamanga, M. Rabetsoa Roger et le responsable du programme Arbres et Plantations du Cirad-forêt, M. Mallet Bernard.

M. Hamon Serge m'a fait l'honneur d'être le Directeur de cette thèse. Durant ces travaux, j'ai pu bénéficier de son expérience et de sa rigueur de travail. J'espère que ce contact avec les forestiers lui aura montré tout l'intérêt des eucalyptus notamment après sa mission à Madagascar. Je remercie particulièrement M. Vigneront Philippe du Cirad-forêt, qui a contribué à la définition du sujet et qui m'a fait bénéficier de ses multiples compétences notamment en génétique forestière. Mes remerciements vont aussi à Mme Gerber Sophie qui a développé, avec ses collègues de l'INRA de Bordeaux, le logiciel FaMoz de recherche en paternité.

M. Maillard Jean-Charles, Mme Chantal Isabelle, et Mme Thévenon Sophie du Cirad-emvt, m'ont chaleureusement accueilli et je les remercie pour le grand pas qu'ils m'ont permis de réaliser dans l'acquisition des données microsatellites. Je remercie également M Rajaonarison Jocelyn qui a identifié, avec l'appui de ses collègues du Fofifa et du PBZT, les insectes récoltés dans le verger.

J'associe à ces remerciements M. Rasamindisa, Mme Rakotovaio Ramasiarivelo Zoeliarisoa et M. Rakotondraoelina Hery qui m'ont libéré de la gestion des vergers à graines et M. Rakotovaio Georges avec son équipe de terrain pour la construction des tours de pollinisation. Messieurs Rakotoarisoa Emilson, Rakotondrasoa Julien, Ratovoson Nirina David m'ont apporté un appui précieux sur le terrain et Mesdames Razafiarivelo Sylvie, Razafimaharo Vololoniriana, Ramanantoandro Tahiana ont contribué grandement à faire avancer nos travaux sur les vergers à graines. Mmes Chevallier Marie-Hélène, Poitel Mireille et M. Vaillant Alexandre m'ont agréablement accueilli dans le laboratoire de génétique forestière du Cirad-forêt. Je les remercie également, tout comme M. Cornu Guillaume et M. de Coligny François du Cirad pour leurs collaborations avisées.

La fin de ces travaux coïncide avec celle de mon séjour à Madagascar, je voudrais en profiter pour saluer toutes les personnes, liées de près ou de loin par la foresterie à Madagascar, que j'ai côtoyées dans la grande Ile et plus particulièrement, M. Rakotonjanahary Jean et son épouse, tous deux disparus depuis, mais qui ont contribué, grâce à leur dévouement, au développement des plantations à Madagascar et à l'amélioration des connaissances en matière forestière.

Je remercie également mes parents pour leur soutien permanent, ainsi que la « troupe » toujours prête à m'accueillir lors de mes séjours montpelliérains. Que mes deux filles, Flore et Marie, reçoivent ici, toute ma tendresse en maigre compensation par rapport à mes absences répétées qu'elles ont subies.

Table des matières

Titre	1
Remerciements	2
Table des matières	3
Liste des publications	7
Liste des annexes	8
Liste des figures	9
Liste des tableaux	10
PREMIER CHAPITRE - INTRODUCTION GENERALE	11
1. CADRE GENERAL ET OBJECTIFS DE LA THESE	11
1.1. Introduction	11
1.2. Problématique	13
1.2.1. Evolution de la structure génétique des populations d'amélioration	13
1.2.2. Les contraintes	13
1.2.2.1. Spécificités des espèces forestières	14
1.2.2.2. Les facteurs incontrôlés	15
1.3. Objectifs de la thèse	16
1.4. Matériel végétal	17
1.5. Méthodologie appliquée	18
1.6. Présentation des différentes parties de la thèse	18
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	20
2.1. Cadre de l'étude	20
2.1.1. Le secteur forestier malgache	20
2.1.2. Les vergers à graines	21
2.1.3. Importance des eucalyptus au niveau mondial	22
2.1.3.1. Part des eucalyptus dans les reboisements mondiaux	22
2.1.3.2. Valorisation du bois d'eucalyptus	23
2.2. Présentation générale des eucalyptus	25
2.2.1. Organisation évolutive du genre Eucalyptus	25
2.2.2. Caractéristiques et spécificités du sous-genre Symphyomyrtus	26
2.3. Biologie des eucalyptus	26
2.3.1. Généralités	26
2.3.1.1. Des graines jusqu'à la plantation	26
2.3.1.2. Potentialités de croissance	27
2.3.2. Biologie de la reproduction	28
2.3.2.1. Biologie florale	28
2.3.2.2. Pollinisation	29
2.3.2.3. Production grainière	30

2.3.3.	Facteurs environnementaux influençant la floraison et la fructification _____	32
2.3.4.	Particularités et conséquences du régime de reproduction _____	33
2.3.4.1.	Caractéristiques du régime de reproduction _____	33
2.3.4.2.	Effets de la dépression consanguine chez les eucalyptus _____	34
2.4.	Situation des eucalyptus à Madagascar _____	36
2.4.1.	L'introduction d'espèces exotiques _____	37
2.4.2.	Intérêt des eucalyptus à Madagascar _____	37
2.4.3.	Amélioration génétique des eucalyptus à Madagascar _____	39
2.5.	Contrôle de la qualité des descendance _____	40
2.5.1.	Les approches classiquement utilisées _____	40
2.5.2.	Principe d'étude des flux de gènes _____	42
2.5.2.1.	Les différentes méthodes d'étude des flux de gènes _____	43
2.5.2.2.	Approches relatives aux recherches de paternité _____	44
2.5.2.3.	Les marqueurs utilisables pour les analyses de paternité _____	45
2.5.3.	Résultats principaux des études de flux de gènes sur les espèces forestières _____	48
DEUXIEME CHAPITRE - MATERIELS ET METHODES _____		50
1.	MATERIEL VEGETAL _____	50
1.1.	Verger à graines _____	50
1.2.	Descendance étudiées _____	51
2.	OBSERVATIONS EFFECTUEES DANS LE VERGER A GRAINES _____	53
2.1.	Inventaires forestiers _____	53
2.2.	Observations sur la floraison _____	53
2.2.1.	Description du développement floral _____	53
2.2.2.	Observations phénologiques _____	54
2.2.3.	Etude de la production grainière du verger à graines _____	55
2.2.4.	Piégeage et identification des insectes pollinisateurs _____	57
2.2.5.	Fécondations contrôlées _____	57
3.	OBSERVATIONS EFFECTUEES SUR LES DESCENDANCES _____	59
3.1.	Inventaires forestiers _____	59
3.2.	Variables transformées _____	59
4.	MARQUEURS MOLECULAIRES _____	59
5.	ANALYSES DES DONNEES - MODELISATION _____	60
5.1.	Analyse des données et estimation des paramètres génétiques _____	60
5.1.1.	Analyses quantitative et qualitative _____	60
5.1.2.	Rappel des notions d'héritabilité _____	61
5.2.	Principes de l'analyse de paternité _____	62
5.2.1.	Probabilité d'exclusion _____	63
5.2.2.	Calcul des LOD scores _____	64
5.2.3.	Simulation et seuils critiques _____	65
5.2.4.	Particularité et applications à notre échantillon _____	66
5.3.	Diversité génétique et structuration des populations _____	67

5.3.1.	Hétérozygotie	67
5.3.2.	Structuration et diversité génétique des populations	67
TROISIEME CHAPITRE - RESULTATS		69
1.	DESCRIPTION DE LA POPULATION PARENTALE	69
1.1	Identification des arbres de bordures	70
1.2	Diversité génétique et structuration du verger à graines	71
1.2.1	Diversité allélique	71
1.2.2	Structuration de la population	71
1.3	Croissance et développement	73
1.3.1	Description et impacts de la sélection effectuée à 5 ans	73
1.3.1.1	Rappels des objectifs de la sélection	73
1.3.1.2	Impact des travaux d'éclaircie sur la composition du verger	74
1.3.2	Evolution des caractères de croissance et conséquences au niveau du houppier	75
1.4	Dynamique de la floraison du verger	78
1.4.1	Dynamique de la floraison	78
1.4.2	Variabilité intra-spécifique de la floraison	79
1.5	Identification de la population de pollinisateurs	80
1.6	La fructification du verger	81
1.6.1	Variabilité intra-spécifique des caractéristiques de la fructification	81
1.6.2	Caractéristiques grainières en fonction du type de pollinisation	82
1.6.3	Caractéristiques grainières en fonction de l'année de production	82
1.7	Conclusions sur les caractéristiques générales des géniteurs	84
2.	ESTIMATION DES FLUX DE GENES DANS LE VERGER	86
2.1	Estimation des flux de gènes potentiels	86
2.1.1	Analyses des observations effectuées	86
2.1.2	Flux de gènes potentiels dans le verger à graines	88
2.2	Estimation des flux de gènes réels	90
2.2.1	Paramètres de l'analyse de paternité	90
2.2.2	Détermination et contributions de la population paternelle	90
2.2.3	Cartes de dispersion pollinique et distances de pollinisation	92
2.3	Conclusions sur l'estimation des flux de gènes dans le verger	94
3.	EVOLUTION DE LA DIVERSITE GENETIQUE ET VALEUR DE LA DESCENDANCE	95
3.1	Evolution de la diversité génétique	96
3.1.1	Diversité allélique et taux d'hétérozygotie de la descendance	96
3.1.2	Comparaison de la diversité allélique entre les deux générations	97
3.1.2.1	Comparaison des distributions alléliques	97
3.1.2.2	Comparaison des distributions alléliques au niveau haploïde	97
3.2	Influence du type de croisement sur la valeur des descendants	99
3.2.1	Les différents types de croisement observés	99
3.2.2	Comportement général de la population	99
3.2.3	Effet du type de croisement sur la croissance des individus	100

3.2.4	Analyse génétique de l'essai de descendance	101
3.2.4.1	Ajustement du dispositif	101
3.2.4.2	Estimations des effets génétiques	102
3.3	Conclusions	103
QUATRIEME CHAPITRE - DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS		104
1.	RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE	104
2.	RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS	105
3.	DISCUSSIONS	106
3.1	Caracteristiques de la population parentale	106
3.1.1	Diversité génétique	106
3.1.2	Développement et croissance	106
3.1.3	Phénologie et pollinisation	107
3.1.4	Fructification	108
3.2	Conséquences des flux de gènes dans le verger	110
3.2.1	Régime de reproduction	111
3.2.2	Contributions des géniteurs au nuage pollinique	112
3.2.3	Taux de contamination pollinique	113
4.	CONCLUSIONS	115
4.1	Applications directes des résultats	115
4.1.1	Sur le programme d'amélioration	115
4.1.2	Sur la qualité et la stabilité de la variété produite	116
4.2	Propositions pour une meilleure gestion des vergers à graines	117
4.2.1	Précautions pour les récoltes de graines	117
4.2.2	Méthodes pour limiter le taux de contamination pollinique	118
4.3	Conclusions sur l'usage des vergers à graines à Madagascar	120

Articles publiés, acceptés ou soumis

Articles publiés :

Chaix G, Ramamonjisoa L (2001). **Production de semences pour les reboisements malgaches.** Bois et Forêts des Tropiques, 269 : 49-63.

Chaix G, Chantal I, Poitel M, Razafiarivelo S, Verhaegen D, Maillard JC (2002). **Microsatellite primer amplification by multiplexing : a first application to *Eucalyptus grandis*.** Plant Molecular Biology Reporter 20: 67a-67e.

Article accepté :

Chaix G, Gerber S, Razafimaharo V, Vigneron P, Verhaegen D, Hamon S. (sous presse). **Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*.** Theoretical and Applied Genetics.

Article soumis :

Chaix G, Vigneron P, Hamon S. **Evidence of differential reproductive contributions among five genetic origins in a *Eucalyptus grandis* seed orchard: consequences for seed production.** (Soumis à Theoretical and Applied Genetics).

Liste des annexes

Annexe 1.	Description des différentes étapes depuis les populations d'origine dans l'aire naturelle jusqu'à l'intégration des résultats de notre étude	a
Annexe 2.	Plan initial du verger à graines d' <i>E. grandis</i> situé sur la station d'Antsirinala	b
Annexe 3.	Plan et situation du verger à graines d' <i>E. grandis</i> au moment de l'étude	c
Annexe 4.	Fréquences alléliques des six locus dans la population parentale	d
Annexe 5.	Evolution des coefficients de variation intra famille de la hauteur, de la circonférence, de la surface terrière individuelle et du volume au moment de l'éclaircie	e
Annexe 6.	Evolution de la variabilité intra famille de 27 à 156 mois de la hauteur, de la circonférence et du volume	f
Annexe 7.	Cartes de dispersion pollinique pour les 30 arbre-mères	g
Annexe 8.	Distributions des pères potentiels et des pères observés	l
Annexe 9.	Plan de l'essai de descendance d' <i>E. grandis</i> situé sur la station de Mahela	m
Annexe 10.	Fréquences alléliques des six locus dans la population de descendants	n
Annexe 11.	Description des modifications apportées au dispositif de l'essai de descendance d' <i>E. grandis</i> par rapport aux effets terrains	o

Liste des figures

Figure 1. Délimitation de l'aire naturelle d' <i>E. grandis</i> en Australie	22
Figure 2. Proportion, en zone subtropicale et tropicale, des surfaces plantées en essences forestières	22
Figure 3. Répartition des surfaces des plantations d'eucalyptus à vocation industrielle, selon les différentes régions	22
Figure 4. Evolution mondiale des plantations d'eucalyptus de 1973 à 2009	22
Figure 5. Evolution, de 1970 à 1994, de la consommation mondiale en bois de feu et en charbon de bois	23
Figure 6. Sciage d'eucalyptus à Madagascar	24
Figure 7. Valorisation du bois d' <i>E. grandis</i> en Afrique du Sud - fabrication de lamellé-collé	24
Figure 8. Valorisation du bois d' <i>E. grandis</i> en Afrique du Sud - Aménagement intérieur	24
Figure 9. Exploitation d'un <i>E. globulus</i> en Australie	24
Figure 10. Variabilité interspécifique de la taille des graines d'eucalyptus	26
Figure 11. Croissance en hauteur de sept espèces d'eucalyptus à Madagascar - Station de Mahela	27
Figure 12. Architecture de l'inflorescence de l' <i>E. grandis</i>	28
Figure 13. Rameau florifère d' <i>E. grandis</i>	28
Figure 14. Pollinisation, par les abeilles, des fleurs d'eucalyptus	28
Figure 15. Les différents stades floraux pour <i>E. grandis</i>	28
Figure 16. Intégration de l'eucalyptus dans le paysage des hauts plateaux malgaches	36
Figure 17. Plantation d' <i>E. grandis</i> sur les sols dégradés de Madagascar	36
Figure 18. Régénération naturelle d'espèces locales sous un couvert d'eucalyptus	36
Figure 19. Extension, entre 1949 et 1994, des plantations d'eucalyptus au nord est d'Antananarivo	37
Figure 20. Vente annuelle, à Madagascar, de graines d'eucalyptus et d' <i>E. grandis</i> par le Silo National des Graines Forestières	38
Figure 21. Schéma du programme d'amélioration génétique, à Madagascar, des espèces feuillues par sélection récurrente à l'aide de vergers à graines	39
Figure 22. Implantations et surfaces correspondantes par station du dispositif de production de semences forestières du FOFIFA/DRFP/Cirad-Forêt	40
Figure 23. Mécanismes d'évolution des microsattellites	47
Figure 24. Localisation des peuplements d'origine des provenances australiennes d' <i>E. grandis</i> concernées par l'étude	50
Figure 25. Vue du verger à graines d' <i>E. grandis</i> à Antsiranala	51
Figure 26. Vue de l'essai de descendances d' <i>E. grandis</i> , 4 mois après la plantation	52
Figure 27. Vue de l'essai de descendances d' <i>E. grandis</i> 18 mois après la plantation	52
Figure 28. Piège à insectes installé dans le verger à graines - vue de dessous	57
Figure 29. Distributions des LOD scores pour les deux populations simulées de descendants	66
Figure 30. Application de l'index de sélection par famille et conséquence sur la hauteur	74
Figure 31. Distribution des géniteurs par classe de hauteur	76
Figure 32. Distribution des géniteurs par classe de projection de houppier	76
Figure 33. Répartition des géniteurs dans le verger : taille du houppier et hauteur totale	76
Figure 34. Spectre de floraison des différentes provenances du verger sur les 3 années d'observation	78
Figure 35. Taux annuels de floraison du verger et moyenne sur trois ans	78
Figure 36. Comparaison annuelle de la dynamique de floraison entre les familles 1 et 3, 1 et 9, 2 et 11	79
Figure 37. Variabilité du nombre exact de graines viables par capsules sur un échantillon de 3 arbres-mères	82
Figure 38. Evolution du nuage pollinique durant la floraison - contributions potentielles des provenances	88
Figure 39. Contributions potentielles annuelles, dans le nuage pollinique, des provenances et des familles et comparaison avec leurs effectifs respectifs dans le verger à graines	88
Figure 40. Evolution du nuage pollinique durant la floraison - contributions potentielles des familles	89
Figure 41. Succès reproducteur et contributions paternelles	91
Figure 42. Comparaison entre le nombre de mâles potentiels par provenance ou par famille et observés.	91
Figure 43. Représentations des contributions polliniques pour 4 arbre-mères	92
Figure 44. Comparaison des distances de pollinisation observée et potentielle pour 4 arbre-mères et l'ensemble des arbre-mères	93
Figure 45. Comparaison des fréquences alléliques des géniteurs et des descendants en données diploïdes	97
Figure 46. Comparaison des fréquences alléliques des géniteurs et des nuages polliniques interne et externe au verger	98
Figure 47. Courbes de croissance, de 9 à 37 mois, de l'essai de descendances	99
Figure 48. Effet de la dépression consanguine due à l'autofécondation sur la valeur agronomique des descendants après une génération	100
Figure 49. Courbes de croissance, de 9 à 37 mois, en hauteur, circonférence et volume des descendants selon le degré d'apparement des géniteurs	100
Figure 50. Comparaison de la hauteur moyenne par colonne de l'essai de descendances	102
Figure 51. Vue partielle de la zone du verger à graines	115

Liste des tableaux

Tableau 1.	Surfaces et espèces principales d'eucalyptus plantées dans les pays possédant des plantations d'eucalyptus en 2000	22
Tableau 2.	Classification simplifiée des eucalyptus et espèces citées	25
Tableau 3.	Comparaison, chez les eucalyptus, du nombre de graines par capsule en fonction du type de croisement	31
Tableau 4.	Estimation de la dépression consanguine (%) chez les eucalyptus sur le taux de survie, la production grainière et les caractères de croissance	34
Tableau 5.	Vente annuelle nationale (kg) du Sngf par groupe d'espèces et surfaces potentielles de reboisement pour l'année 1999	38
Tableau 6.	Dispositif de production en semences d' <i>E. grandis</i> à Madagascar	41
Tableau 7.	Comparaison des caractéristiques générales des différents types de marqueurs et de leur pertinence pour l'analyse de paternité	45
Tableau 8.	Description des provenances du verger d' <i>E. grandis</i>	50
Tableau 9.	Composition initiale et actuelle du verger à graines d' <i>E. grandis</i>	51
Tableau 10.	Caractères mesurés lors des différents inventaires du verger à graines	53
Tableau 11.	Echantillonnage des descendances pour l'étude de la production semencière	55
Tableau 12.	Caractères mesurés lors des différents inventaires de l'essai de descendances	59
Tableau 13.	Paramètres de l'analyse de la variance concernant la population parentale	60
Tableau 14.	Paramètres de l'analyse de la variance concernant la population de descendants	61
Tableau 15.	Probabilités d'exclusion de paternité dans un système à 2 allèles co-dominants	63
Tableau 16.	Effectifs des provenances et des familles du verger à graines d' <i>E. grandis</i>	70
Tableau 17.	Paramètres de diversité sur les 6 loci microsatellites des géniteurs du verger à graines regroupés par provenance	71
Tableau 18.	Distances génétiques entre les provenances	72
Tableau 19.	Résultats de l'analyse de la variance et comparaison des valeurs familiales moyennes du verger de 27 à 156 mois	75
Tableau 20.	Effets provenance et famille sur la forme du houppier - Comparaisons des moyennes par provenances et par famille	76
Tableau 21.	Coefficients de corrélation entre les caractères de croissance de la population parentale de 27 à 126 mois	77
Tableau 22.	Estimation des héritabilités à partir des résultats de l'analyse de la variance	77
Tableau 23.	Taux annuel de floraison des provenances et des familles	78
Tableau 24.	Résultats de l'analyse de variance des caractères de floraison et comparaison des moyennes familiales	79
Tableau 25.	Liste des espèces d'insectes capturées dans le verger à graines au moyen de filet à papillon et d'un filet passif	80
Tableau 26.	Variabilité intra-spécifique des caractéristiques grainières – Effets provenance et famille	81
Tableau 27.	Variabilité intra-spécifique des capsules d' <i>E. grandis</i> - Effets provenance et famille	81
Tableau 28.	Comparaison des caractéristiques grainières selon le type de croisement	82
Tableau 29.	Comparaison des caractéristiques moyennes des capsules de 1998 et 1999	82
Tableau 30.	Probabilité d'exclusion (EP) et probabilité d'identité (IP) pour les six loci microsatellites de la population parentale	90
Tableau 31.	Résultats de l'analyse de paternité des 30 descendances étudiées	90
Tableau 32.	Comparaison de la part des provenances et des familles entre la population parentale et la population de mâles identifiés	91
Tableau 33.	Paramètres de diversité de la population de descendants pour les six locus	96
Tableau 34.	Variation allélique (perte/gain) entre la population parentale et la population de descendants	96
Tableau 35.	Caractéristiques générales de la croissance d' <i>E. grandis</i> dans l'essai de descendances	99
Tableau 36.	Résultats de l'analyse de variance de l'essai de descendances de 9 à 37 mois - Effets famille et type de croisement	100
Tableau 37.	Comparaison de la valeur agronomique des descendants entre les différents niveaux d'apparement des géniteurs	100
Tableau 38.	Résultats de l'analyse de variance de l'essai de descendances de 9 à 37 mois - Effets familles sur les caractères de croissance	102
Tableau 39.	Estimation des héritabilités individuelles et familiales calculées à partir des données recueillies dans l'essai de descendances	102
Tableau 40.	Revue des études relatives aux flux de gènes	110

PREMIER CHAPITRE
INTRODUCTION GENERALE

PREMIER CHAPITRE - INTRODUCTION GENERALE

1. CADRE GENERAL ET OBJECTIFS DE LA THESE

1.1. INTRODUCTION

La très forte demande en bois domestique des pays tropicaux a conduit à l'établissement de plantations d'essences forestières à croissance rapide. Ces espèces, essentiellement des genres *Pinus*, *Eucalyptus* et *Acacia*, allient pour la plupart qualité du bois, plasticité, forme souvent excellente et production rapide et économique.

Le bois à Madagascar couvre de 80 à 90 % des besoins en énergie domestique. A titre d'exemple, les besoins en bois énergie de la capitale (un million d'habitants) s'élevaient en 1992 à plus de 1.000.000 t/an. L'approvisionnement est couvert à 93 % par les taillis d'eucalyptus des plantations paysannes qui représentent la première culture de rente dans les zones de production (Bertrand 1992). Conséquence de la dégradation des forêts naturelles et donc de leur protection, la part des eucalyptus dans la production de bois de service et d'œuvre devient de plus en plus importante. Selon les derniers inventaires effectués, les peuplements forestiers artificiels en eucalyptus couvriraient 147.000 ha (Randrianjafy 2000). Compte tenu des besoins grandissant de la population et du développement de Madagascar, la volonté du gouvernement malgache est d'inciter au reboisement et tout porte à croire que les surfaces plantées vont connaître un développement important. Si les premières plantations ont pu être réalisées avec des graines importées, récoltées directement dans l'aire d'origine, les besoins sont rapidement devenus si élevés qu'il s'est avéré indispensable, à Madagascar comme ailleurs, de disposer localement de parcelles grainières.

Le verger à graines est probablement le dispositif le plus couramment utilisé à cette fin (Eldridge 1975). Des individus, sélectionnés ou non, sont disposés de façon aléatoire sous la contrainte d'éloignement maximal entre apparentés et vont mutuellement se polliniser de façon à produire des graines recombinant les caractères parentaux. La parcelle est gérée de façon à promouvoir un développement rapide des houppiers et une floraison abondante et précoce, par l'utilisation de forts écartements de plantation et un travail cultural soigné (entretiens, fertilisations, ...).

Afin de subvenir aux besoins des reboisements, le Cirad-forêt (Centre de Coopération Internationale de Recherche Agronomique pour le Développement - Département forêt) et le FOFIFA (Centre National de la Recherche Agronomique pour le Développement Rural), associés au SNGF (Silo National des Graines Forestières) ont mis en place un important dispositif de production grainière couvrant l'ensemble des zones bioclimatiques de Madagascar (Chaix et Ramamonjisoa 2001). A terme, ce dispositif permettra l'autosuffisance pour les principales espèces de reboisement.

Les objectifs fixés aux vergers à graines d'espèces forestières sont généralement multiples. En effet, outre la production de graines améliorées et selon que tout ou seulement une partie des individus est récoltée, ils jouent un rôle primordial dans la conservation des ressources génétiques. Les variétés produites par ces vergers à graines sont destinées aux plantations villageoises. Pour répondre à ces contraintes, il faut produire des variétés combinant productivité et plasticité permettant ainsi de maintenir une production régulière dans des environnements différents. L'enjeu est alors d'effectuer des sélections et simultanément de maintenir la variabilité génétique des populations.

L'efficacité du brassage va cependant conditionner la réalisation des objectifs assignés au verger : est-elle suffisante pour assurer la conservation de l'ensemble des gènes ou conduit-elle à une réduction de la taille efficace de la population ? Permet-elle de considérer comme valides les principales hypothèses implicitement contenues dans les modèles génétiques ou ne conduit-elle pas à une inefficacité de la sélection ?

La biologie de la reproduction des principales espèces d'eucalyptus est relativement bien décrite dans l'aire naturelle. Préférentiellement allogames, elles supportent, cependant, un taux non négligeable d'autogamie. La proportion de croisements autogames est très variable et dépend, outre des individus, des conditions locales d'environnement. Le régime de reproduction, en dehors de la zone d'origine, a été jusqu'à présent très peu étudié alors même que la pollinisation libre est le mode de reproduction habituel utilisé dans les programmes d'amélioration génétique et de production grainière.

1.2. PROBLEMATIQUE

1.2.1. Evolution de la structure génétique des populations d'amélioration

L'évolution des populations est soumise à des évènements plus ou moins contrôlés qui modulent la diversité génétique à des échelles de temps différentes. Trois facteurs l'augmentent : i) la recombinaison, lorsque l'on constitue les vergers à graines à partir de populations différentes qu'elles soient issues de vergers de génération n-1 ou des réintroductions de ressources génétiques ; ii) la migration due au flux de pollen externe au verger, iii) et les mutations. Deux la réduisent : i) la sélection effectuée dans les populations pour constituer les populations de génération n+1 ; ii) la réduction de la taille efficace des populations due aux écarts à la panmixie du fait de la floraison, du succès reproducteur, des flux préférentiels de pollen et de l'échantillonnage, volontaire ou non, réalisé lors de la récolte des graines. Ces forces et leurs dynamiques dépendent des caractères biologiques de l'espèce considérée, des choix du sélectionneur et des conditions environnementales.

L'estimation des contributions maternelles dans la descendance et leur rééquilibrage semble, *a priori*, facile à réaliser par la simple pesée des graines et l'estimation de leur capacité germinative. Les contributions paternelles ne sont pas ou ne sont que partiellement contrôlées. La « randomisation » des génotypes au sein d'un verger favorise le brassage génétique. Toutefois, elles restent inconnues et on doit alors faire l'hypothèse que chaque géniteur femelle reçoit un nuage pollinique reflétant la diversité des géniteurs mâles présents. Pour *Eucalyptus rameliana*, Sampson (1998) montre, par exemple, une paternité multiple des graines pour un même fruit. Cette hypothèse reste à vérifier et fait l'objet des travaux de cette thèse.

1.2.2. Les contraintes

Plusieurs contraintes particulières à l'amélioration des arbres doivent être prises en compte : la durée des cycles d'amélioration, l'absence de domestication comparativement aux espèces agricoles, une variabilité génétique souvent importante des espèces, un fort encombrement spatial, et une utilisation en dehors de l'aire naturelle. La plupart de ces caractéristiques et contraintes conduit à la structuration du peuplement que ce soit sur le plan génétique, architectural ou dans le temps. Ceci, peut déséquilibrer les contributions parentales du verger dans la constitution de la génération suivante, à travers la qualité et l'efficacité des flux de pollen dans les vergers.

1.2.2.1. Spécificités des espèces forestières

La durée des cycles d'amélioration est de 25 ans pour les résineux, 15 ans pour les peupliers et 7 ans pour les eucalyptus destinés à la production de pâte à papier. Par rapport aux espèces annuelles, ceci conduit à l'augmentation, des risques de dégradation ou de destruction des dispositifs d'expérimentation. Ceci nécessite de disposer de suffisamment de moyens, de mobiliser de l'espace sur des périodes assez longues ou de développer des approches ou des techniques raccourcissant la durée des cycles. Chez les eucalyptus, Bouvet (1995) a montré, sur les caractères de croissance, que les valeurs des génotypes, à trois ans et demi, constituent une bonne estimation de celles à l'âge adulte (7 ans). Les traitements physiques comme le cernage des racines ou chimiques avec le placobutrazol, limitant le développement végétatif et favorisant l'induction florale, permettent de raccourcir la durée des cycles d'amélioration (Cauvin 1991, Moncur *et al.* 1994).

Par rapport aux espèces agricoles, les essences forestières ne sont pas domestiquées, elles correspondent à du matériel sauvage. Cet état est associé à une forte variabilité génétique pour de nombreux caractères, y compris ceux liés à la croissance ou à la floraison. Cette variabilité est liée au mode de reproduction allogame, à l'aire naturelle parfois très étendue et aux résultats des forces évolutives de la sélection naturelle. C'est le cas, par exemple, d'*Eucalyptus urophylla* que l'on rencontre à partir de 90m et jusqu'à 3000 m d'altitude (House et Bell 1994). Toutefois, cette variabilité, le plus couramment évaluée à partir des caractères de croissance et de forme, est porteuse d'importants gains génétiques.

Les vergers à graines sont installés en milieu non contrôlé. Ainsi, mis à part le choix du terrain et le travail du sol qui tendent à uniformiser les conditions, le sélectionneur ne maîtrise ni la variabilité - physique ou biotique - du milieu, ni les aléas climatiques pouvant se produire tout au long de la vie de l'arbre. Dans ces conditions, on peut estimer que les interactions génotype-environnement sont importantes. Les travaux menés à Madagascar (Drfp 1990, Lebot et Ranaivoson 1994, Chaix et Ramamonjisoa 2001) en matière de choix d'espèces et d'estimation de la variabilité intraspécifique ont porté sur l'évaluation de la mortalité, de l'état sanitaire et des caractères de croissance. Aucune étude n'a encore été menée sur la phénologie des eucalyptus et leur mode de reproduction en relation avec le milieu. Ce genre ne présente habituellement aucun problème de floraison et sa fructification est abondante. Néanmoins, si plusieurs études ont été menées dans l'aire naturelle, très peu de résultats sont publiés sur la reproduction en zone d'introduction (vecteurs de pollinisation, mode de reproduction, *etc.*) et sur les conséquences au

niveau des descendance.

1.2.2.2. Les facteurs incontrôlés

Les graines d'eucalyptus sont disséminées simplement sous l'effet de leur poids, correspondant à la barichorie. Leur petite taille permet au vent de jouer un rôle complémentaire. En conséquence, les distances de dissémination ne dépassent pas deux à trois fois la hauteur des semenciers. Elles conduisent, dans les peuplements naturels, à l'existence de groupes d'individus apparentés de différentes générations, appelés cercles de consanguinité (Florence 1996). Cette structuration des populations naturelles a une forte influence sur la composition des lots de graines récoltés. Les informations de base sur la station et les arbres sélectionnés et récoltés sont notées. En revanche, peu de données sont disponibles sur le peuplement dans son ensemble et le mode de reproduction à l'origine des graines récoltées. Néanmoins, les lots peuvent être constitués à partir d'un nombre important de semenciers. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que le nuage pollinique échantillonné est représentatif du peuplement.

Dans les peuplements naturels comme dans les plantations, l'environnement immédiat des arbres dépend des ressources du milieu (éléments minéraux, disponibilité en eau, lumière) et de la compétition entre individus essentiellement liée à la densité de plantation. En milieu non contrôlé, l'accès à ces ressources n'est pas équilibré. Certains arbres plus exposés à la lumière, par exemple, développent un houppier plus important et prospectent de façon plus efficace les ressources du sol par un développement racinaire plus important (exemple des arbres en bordure de parcelle). Ceci conduit à une structuration du peuplement en arbres dominants, codominants et dominés et peut donc mener à des croisements préférentiels entre arbres de même statut et, par exemple, à une sur-représentation des arbres dominants. Par ailleurs, Patterson *et al.* (2001) ont montré que le régime de reproduction varie selon le niveau de la canopée.

La phénologie de la floraison joue un rôle important dans les flux géniques et donc dans les écarts potentiels à la panmixie. La maturité sexuelle intervient plus ou moins tôt, ceci en fonction du génotype et de l'environnement dans lequel il est placé. La variété produite par le verger est donc susceptible d'évoluer d'une génération à l'autre. L'asynchronisme partiel entre les arbres précoces et tardifs contribue aussi aux écarts à la panmixie. Enfin, la régularité inter-annuelle des processus phénologiques est de première importance pour l'échange de gènes, le succès de la reproduction et la stabilité de la variété produite.

Les insectes pollinisateurs, essentiellement les abeilles, ont un rôle majeur dans les flux de pollen. Leur comportement dépend de la disponibilité en pollen et en nectar. La production, généralement abondante de capsules et de graines, n'a pas suscité de questionnement précis sur la capacité grainière des eucalyptus. Classiquement, on estime qu'en zone d'introduction la présence d'abeilles est suffisante pour assurer une bonne production grainière. Mais, en pollinisation libre, l'efficacité pollinisatrice moyenne des insectes n'est pas optimale car les croisements contrôlés montrent une nette augmentation du nombre de graines viables par capsules en condition saturante en pollen (Hodgson 1976a, Moncur *et al.* 1995). Les arbres constituant les différentes strates architecturales des vergers peuvent être pollinisés par des groupes d'insectes différents ayant une efficacité pollinisatrice différente. Ces observations globales masquent, sans aucun doute, des variabilités individuelles importantes corrélées ou non avec la morphologie des fleurs et des fruits, en relation probablement, avec le phénotype de l'arbre.

1.3. OBJECTIFS DE LA THESE

La mise en place d'un verger à graines suppose implicitement une reproduction panmictique des individus. La qualité de la production variétale et l'estimation des paramètres génétiques, déterminant l'efficacité des sélections, sont basées sur des hypothèses qui n'ont pour le moment pas été vérifiées. Dans ces parcelles, la reproduction est supposée aléatoire et la population être en équilibre de Hardy Weinberg. Les hypothèses suivantes doivent alors être remplies :

- l'effectif de la population peut-être considéré comme infini ;
- tous les individus participent, à part égale, à la constitution de la génération suivante ;
- les croisements entre les individus se font au hasard et notamment, il n'y a pas de croisements préférentiels ;
- l'absence de sélection : tous les génotypes ont la même viabilité ;
- l'absence de migration : pas d'apport d'allèles nouveaux ;
- absence de mutation.

Malgré toutes les précautions prises lors de l'établissement des vergers à graines, outre l'existence de croisements privilégiés entre voisins du seul fait des proximités géographiques, de nombreux facteurs sont, comme nous l'avons vu, sources d'écarts à la panmixie :

- le manque de synchronisme de la floraison, en particulier, entre individus d'origines géographique et écologique différentes constitue une barrière infranchissable aux flux de gènes ;

- l'abondance de la floraison, et donc la part prise par chacun des individus dans la constitution de la variété attendue, peut être très irrégulière ;
- en outre, l'irrégularité naturelle de la floraison, l'effet d'une saison aux pluies particulièrement abondantes ou parcimonieuses peuvent conduire à d'importantes variations inter annuelles de la quantité et, en cas d'interactions génotype-environnement, de la qualité de la récolte de graines ;
- le pourcentage d'autofécondation n'est pas nul, il peut varier d'un individu à l'autre ;
- les flux polliniques sont tributaires de l'abondance et de l'activité des insectes pollinisateurs, ils peuvent être insuffisants ou a contrario, tels, qu'ils conduisent à de l'apport de pollen externe ;
- l'incompatibilité stricte ou partielle de certains génotypes peut limiter le brassage génétique.

L'efficacité de la conservation et de la sélection repose sur une bonne connaissance des processus de la reproduction. Comme il vient d'être exposé, de nombreux facteurs conduisent à des écarts à l'hypothèse de panmixie ayant des conséquences importantes sur la taille efficace des populations et à des prédictions erronées de l'évolution des populations en terme de diversité génétique. L'objectif de cette thèse est donc d'estimer le mode de reproduction, de mesurer les écarts à la panmixie et d'en déterminer les principaux effets sur la valeur de la variété-population récoltée et sur l'efficacité de la sélection. Il s'agit donc de décrire, de comprendre et si possible d'améliorer le fonctionnement du système.

1.4. MATERIEL VEGETAL

Eucalyptus grandis constitue une plante modèle dans la mesure où elle appartient au sous-genre *Symphyomyrtus* qui renferme la plupart des eucalyptus d'intérêt majeur au niveau mondial. Elle est, d'ailleurs, l'une des espèces d'eucalyptus principales pour le reboisement. Elle couvre plus de trois millions d'hectares dans la zone subtropicale et est utilisée à la fois pour la production de bois d'œuvre, bois de trituration (papier, viscosé) et de bois énergie. Sa production est exceptionnellement forte, couramment autour de 20-30 m³ha⁻¹an⁻¹, mais atteignant souvent 40 à 50 m³ha⁻¹an⁻¹. A Madagascar, elle constitue l'espèce la plus intéressante pour les reboisements de production sur tout le versant Est.

Le verger à graines étudié est constitué de 349 individus d'*E. grandis* sélectionnés dans 11 descendances de 4 provenances récoltées dans l'aire naturelle de l'espèce (côte Est de l'Australie) et d'une provenance malgache. La population de descendants est constituée par 30 familles de demi-frères, récoltées dans le verger, issus de pollinisation libre pour un total de 724 individus.

1.5. METHODOLOGIE APPLIQUEE

Notre approche s'articule autour de trois points : i) caractérisation de la population parentale ; ii) estimation des flux de gènes réels pour une saison de floraison ; iii) évaluation de ces flux de gènes sur l'évolution de la diversité génétique et la valeur de la descendance. La diversité des questions et des phénomènes en cause conduit à l'utilisation d'approches variées plus ou moins spécifiques à l'une ou à l'autre population.

Les marqueurs microsatellites seront utilisés afin de caractériser l'ensemble des 349 individus du verger constituant la population parentale. Ces données permettront l'évaluation de la diversité génétique et la description de sa structuration. L'étude précise de la phénologie (importance, durée et pic de floraison) de chaque individu pendant 3 saisons de floraison apportera des éléments de compréhension sur le fonctionnement du verger : apparentements potentiels, asynchronisme, importance de la production grainière. Cette étude sera précisée par le piégeage puis l'identification des insectes pollinisateurs et les résultats de croisements en pollinisation contrôlée.

Un échantillon de graines récoltées sur des géniteurs bien identifiés sera analysé à l'aide des marqueurs microsatellites. La recherche en paternité de chaque graine permettra de retracer les événements de pollinisation réussis à l'origine de ce lot. Enfin, et afin de prédire la valeur de la variété récoltée, les individus obtenus à partir de ces lots seront mis au champ et leurs performances en croissance seront analysées en fonction du degré d'apparentement des géniteurs.

1.6. PRESENTATION DES DIFFERENTES PARTIES DE LA THESE

A certains endroits du document, nous faisons référence aux articles relatifs à cette thèse placés en fin de document. Néanmoins, la structure du document est telle que sa compréhension ne nécessite pas la lecture de ces articles. Le document débute par une partie introductive présentant le cadre de l'étude. Elle est suivie par la description du matériel végétal, des techniques et des analyses employées. Les résultats sont présentés en trois parties. La première concerne la typologie des géniteurs à partir des données d'inventaires sur la croissance et sur la phénologie dans l'objectif d'estimer les flux de gènes potentiels. Dans la deuxième partie, nous présentons les résultats des recherches en paternité à partir des données moléculaires des géniteurs et des descendants. Et la troisième partie des résultats porte sur la description de la diversité génétique

entre les deux générations et la valeur agronomique des descendants en fonction des différents types de croisements. Pour finir, nous discutons des effets de la reproduction, en relation avec les caractéristiques du verger et des descendants, sur la gestion du verger à graines et sur les méthodes destinées à accroître l'efficacité de nos travaux en terme de conservation et d'amélioration des eucalyptus à Madagascar.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. CADRE DE L'ETUDE

2.1.1. Le secteur forestier malgache

Nous reprenons ici les points principaux du secteur forestier malgache détaillés par Chaix et Ramamonjisoa (2001) en fin de document.

A Madagascar, la forêt naturelle couvre 10,3 millions d'hectares. Elle renferme une biodiversité unique puisque 80% des espèces sont endémiques. Les forêts malgaches ont une dynamique de croissance faible, caractéristique des forêts d'altitude, et renferment un nombre important d'espèces d'intérêt économique. Elles sont exploitées pour les essences nobles (Palissandre, Ebène, Bois de rose, Hintsy, ...), pour l'approvisionnement en bois de la population, à 80% rurale, et pour les besoins en surface agricole par leur défrichement. L'accessibilité restreinte des forêts dues à leur protection conduit à la surexploitation de certaines d'entre-elles jusqu'à des stades de dégradation irréversibles mettant en péril la production agricole et donc l'alimentation de la population.

A la différence des espèces locales, l'usage d'espèces exotiques permet la constitution rapide de peuplements forestiers et répond à l'augmentation des besoins en bois que nécessite le développement du pays. Le choix de ces essences a demandé de lourds travaux en matière d'essais et d'acquisition des connaissances sylvicoles. Les eucalyptus et les pins sont les genres les plus adaptés aux conditions écologiques variées de Madagascar. A l'heure actuelle, la surface reboisée couvre 316 000 hectares constitués pour moitié d'eucalyptus. L'intérêt de ces derniers repose sur leur croissance rapide et sur la fourniture de bois à usages multiples. Les travaux plus récents de la recherche forestière concernent l'étude de la variabilité intra-spécifique des espèces principales de reboisement et l'approvisionnement en semences de qualité au moyen de verger à graines.

2.1.2. Les vergers à graines

Un verger à graines forestier est, selon la définition de l'O.C.D.E. (Organisation de Coopération et de Développement Economique) : « une plantation de clones ou de descendances, suffisamment isolée ou spécialement gérée pour que les pollinisations exogènes soient inexistantes ou faibles, conduite pour obtenir une production de graines fréquente, abondante et de récolte aisée ».

Le concept de verger à graines fait son apparition dans les années 1920 (Zobel *et al.* 1958). Ils concernaient essentiellement les résineux et à plus petite échelle les espèces feuillues (Koski 1975). En France, plus de 500 hectares de vergers à graines, pour moitié de vergers à graines de clones, ont été installés depuis 1973 par l'Inra, le Cemagref et l'Onf l'ensemble financé par l'état et l'Afocel. Ils devraient assurer, potentiellement, l'approvisionnement pour 2 millions d'hectares de plantations en France et à l'étranger. Ils concernent 9 essences résineuses : Douglas, Epicéa, Mélèze d'Europe et du Japon, Pin Sylvestre, Pin Laricio de Calabre et de Corse, Pin maritime, Sapin Bormüller ; et plusieurs espèces feuillues : Merisier, Erable, Chêne rouge, Aulne, *etc.* Les gains attendus de ces vergers se situent entre 15 et 30% selon les espèces et le caractère considéré. Plus récemment, les vergers d'équivalent-clone de pin maritime, basés sur des descendants issus de polycross, pourraient apporter des gains estimés à 50% sur la vigueur (Plomion *et al.* 2001).

En ce qui concerne les eucalyptus (Eldridge 1975, Hodgson 1977), le premier verger à graines de semis (*E. maculata*) date des années 1950 au Brésil. Ensuite, des vergers ont été plantés en Floride (*E. robusta*) et en Australie (*E. regnans*, *E. grandis*, *E. diversicolor*, *E. deglupta*). Parallèlement, des vergers à graines de clones ont été installés pour *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. gomphocephala* au Maroc entre 1958 et 1962, en Australie (*E. melliodora*) en 1963, en Afrique du Sud et en Zambie (*E. grandis*, *E. saligna*) entre 1964 et 1972. En zone tempérée, au Portugal, les premiers vergers de clones d'*E. globulus* plantés en 1970 ont fait suite aux vergers à graines de semis installés dès 1966.

En Afrique, les travaux dans ce domaine concernent principalement le Maroc, l'Afrique du sud, le Congo, le Ghana, Madagascar, la Zambie, le Zimbabwe. Le dispositif malgache est unique puisqu'il est constitué de vergers à graines de semis, de clones ou de familles pour 10 espèces d'eucalyptus, 5 espèces de pins, 4 espèces d'acacias australiens ou africains, 2 espèces de casuarina et 6 autres essences. Il faudrait rajouter à ceci les peuplements semenciers classés et gérés par le Sngf. Les détails du dispositif malgache sont donnés par Chaix et Ramamonjisoa (2001).

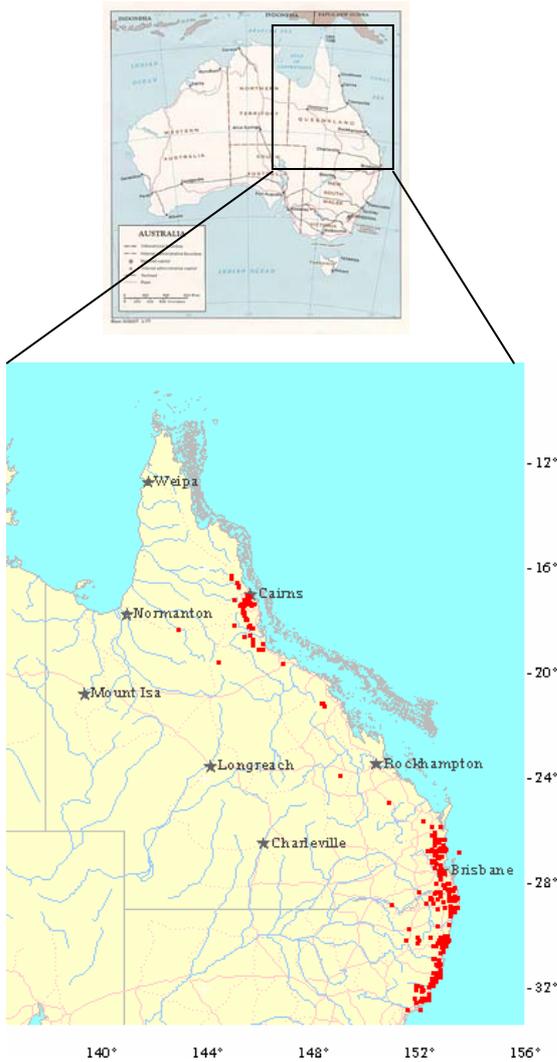


Figure 1. Délimitation de l'aire naturelle d'*E. grandis* en Australie

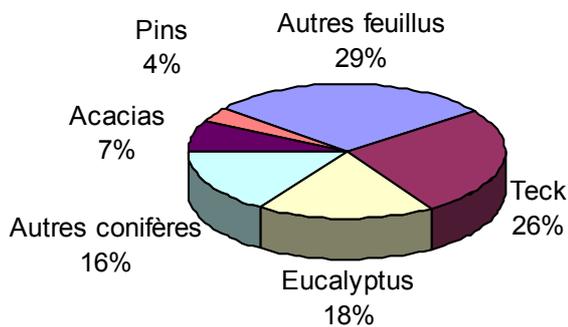


Figure 2. Proportion, en zone subtropicale et tropicale, des surfaces plantées en essences forestières

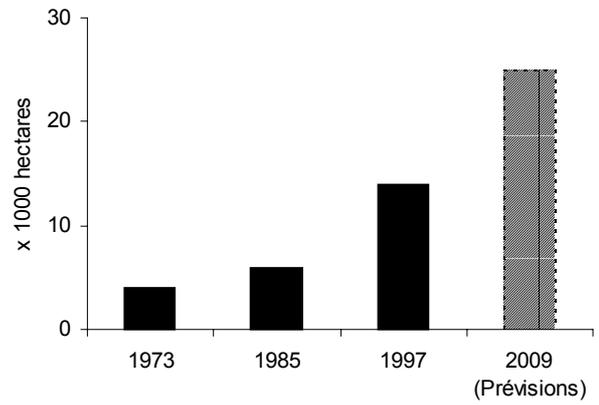


Figure 3. Evolution mondiale des plantations d'eucalyptus de 1973 à 2009 (FAO 2000)

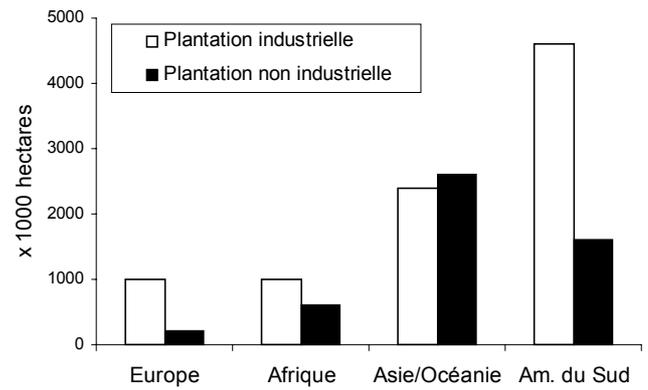


Figure 4. Répartition des surfaces des plantations d'eucalyptus à vocation industrielle, selon les différentes régions (Pandey 1997)

Tableau 1. Surfaces et espèces principales d'eucalyptus plantées dans les pays possédant des plantations d'eucalyptus en 2000 (Revista da Madeira 2001)

Pays	Surface (ha)	Espèce principale
Afrique du Sud	600 000	<i>E. grandis</i>
Angola	135 000	<i>E. tereticornis</i>
Argentine	240 000	<i>E. grandis</i>
Bésil	2 955 000	<i>E. grandis</i>
Chili	317 000	<i>E. globulus</i>
Chine	670 000	<i>E. excerta</i>
Congo	46 000	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
Espagne	550 000	<i>E. globulus</i>
Ethiopie	95 000	<i>E. globulus</i>
Inde	4 800 000	<i>E. tereticornis</i>
Madagascar	147 000	<i>E. robusta</i>
Maroc	200 000	<i>E. camaldulensis</i>
Pérou	211 000	<i>E. globulus</i>
Portugal	690 000	<i>E. globulus</i>
Afrique du sud	470 000	<i>E. grandis</i>
Espagne	390 000	<i>E. globulus</i>
Uruguay	302 000	<i>E. globulus</i>
Vietnam	245 000	<i>E. camaldulensis</i>

2.1.3. Importance des eucalyptus au niveau mondial

L'aire naturelle du genre *Eucalyptus* se situe entre 7° de latitude nord et 43° de latitude sud, sur l'ensemble du continent australien et de la Tasmanie. Seules deux espèces ont une aire de répartition hors de l'Australie : *Eucalyptus deglupta* (Papouasie Nouvelle-Guinée, Célèbes, Céram, Philippines) et *E. urophylla* (archipel de la Sonde, Timor, îles de Flores et Wetar). L'aire naturelle d'*E. grandis* se situe essentiellement sur la côte Est de l'Australie entre 16° et 34° de latitude sud et 143 à 154° de longitude est (figure 1).

2.1.3.1. Part des eucalyptus dans les reboisements mondiaux

Les plantations forestières, avec une superficie de 180 millions d'hectares (FAO 1997) et une forte productivité, jouent un rôle prépondérant dans la foresterie mondiale. Depuis les années 1980, leur forte extension a surtout été observée dans les pays tropicaux et subtropicaux. Parmi les espèces forestières les plus utilisées, celles du genre *Eucalyptus* se distinguent par leur croissance juvénile forte et la productivité des plantations dans des conditions écologiques très variées en zone tropicale, sub-tropicale et tempérée.

Avec la progression rapide des plantations d'eucalyptus durant les 20 dernières années, ce genre représente 18% des surfaces reboisées dans la zone sub-tropicale et tropicale (figure 2). Les surfaces plantées en eucalyptus connaissent un accroissement soutenu et continu se traduisant par un doublement de surface tous les 10 ans. Au niveau mondial de 1973 à 2000, les plantations sont passées de 4 millions à plus de 16 millions d'hectares (figure 3) recensés sur 73 pays (Davidson 1995). En 1997, 9 millions d'hectares étaient du ressort des plantations industrielles et 5 concernaient la foresterie paysanne (figure 4).

Les espèces introduites, dans les différents pays, depuis le début du XX siècle sont au nombre de 150 (Vigneron 2000). Rares sont les genres ayant connu une diffusion avec un si grand nombre d'espèces. Cependant, malgré toutes ces introductions, moins d'une trentaine d'espèces (tableau 1) est exploitée de façon significative en plantation. Quatre espèces, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. tereticornis* et *E. grandis* occupaient, à la fin des années 1980, plus de la moitié des surfaces plantées (Eldridge *et al.* 1993). En moins de dix ans, *E. globulus* pour la péninsule ibérique et les hybrides interspécifiques *E. urophylla* x *E. grandis* du Brésil et du Congo ont fortement pénétré le marché européen de la pâte à papier mais d'autres espèces pourraient fournir des produits tout aussi satisfaisants (Cotterill et Brodin 1997).

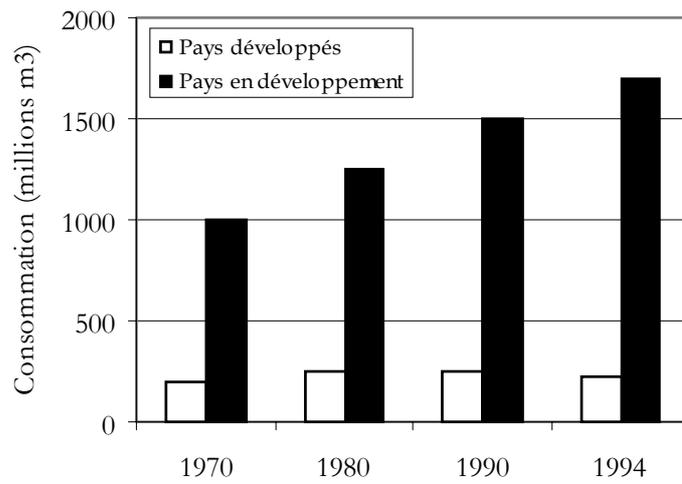


Figure 5. Evolution, de 1970 à 1994, de la consommation mondiale en bois de feu et en charbon de bois (Bouvet 2000)

Le classement par ordre décroissant de production est le suivant : *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. saligna*, *E. deglupta*, *E. exerta*, *E. citriodora*, *E. paniculata*, *E. robusta*. Cependant, la production est largement tributaire des conditions bioclimatiques et chacune des quatre principales espèces, précédemment citées, est plantée dans une zone géographique bien déterminée. Les hybrides interspécifiques naturels et plus récemment ceux issus de croisements contrôlés pour les besoins des programmes de sélection ont permis le développement de la foresterie clonale. Ces variétés connaissent un développement de plus en plus important s'expliquant par une productivité accrue par rapport aux espèces pures : 30-45 m³ha⁻¹an⁻¹ au Brésil. Les programmes d'amélioration et la mise au point de la conduite sylvicole apportent à chaque cycle de sélection des progrès notables. Au Congo, inférieure à 10 m³ha⁻¹an⁻¹ en 1970, la production est passée à 25 m³ha⁻¹an⁻¹ (Vigneron 2000). La foresterie clonale est destinée aux sociétés de reboisements industriels. En revanche, les reboisements paysans reposent sur les espèces pures diffusées sous forme de graines.

2.1.3.2. Valorisation du bois d'eucalyptus

Par rapport à d'autres spéculations agricoles de type « plante pérenne », les surfaces concernées par les plantations d'eucalyptus sont comparables à celles consacrées au palmier à huile et à l'hévéa (FAO, 2002). La valeur économique de l'eucalyptus, dans le commerce mondial, dépend essentiellement du marché de la pâte à papier. Au milieu des années 1990, celui-ci était de 174 millions de tonnes (FAO 1997) dont 31 millions provenaient de bois d'eucalyptus (Wilson *et al.* 1995). Leur part s'est accrue, avec celle des feuillus, aux dépens des résineux (10% en 1950 à 30% en 1997). Les caractéristiques physiques du bois d'eucalyptus et son prix de revient expliquent cette évolution. A titre d'exemple, le Maroc est devenu producteur et exportateur de pâte à papier grâce aux plantations d'*Eucalyptus camaldulensis* réalisées dans les années 1980 (Bouvet 1999).

Dans les pays du Sud, le bois énergie constitue un débouché important du bois d'eucalyptus. La consommation, pour ce type d'usage, est plus difficile à évaluer puisque la production est auto consommée et qu'elle ne fait pas l'objet de commerce international. Entre les années 1970 et 1994, les utilisations domestiques de bois de feu et de charbon de bois ont beaucoup plus augmenté dans les pays en développement par rapport aux pays industrialisés (figure 5).



Figure 6. Sciage d'eucalyptus à Madagascar



Figure 8. Valorisation du bois d'*E. grandis* en Afrique du Sud



Figure 7. Valorisation du bois d'*E. grandis* en Afrique du Sud -

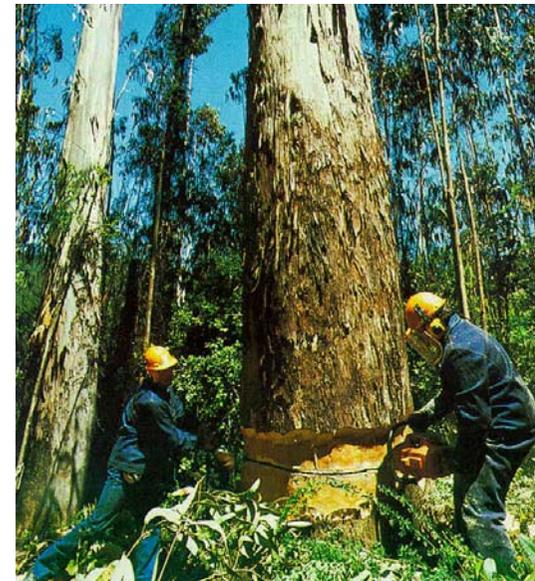


Figure 9. Exploitation d'un *E. globulus* en Australie

Tableau 2. Classification simplifiée des eucalyptus et espèces citées (Vigneron et Bouvet 1997)

Sous genre	Nombre d'espèces	Section	Nombre d'espèces	Principales espèces introduites à Madagascar
<i>Blakella</i>	8	<i>Lemuria</i>	8	-
<i>Corymbia</i>	34	<i>Rufaria</i>	26	<i>gummifera, intermedia</i>
		<i>Ochraria</i>	8	<i>ex-citriodora, ex-maculata, torelliana</i>
<i>Eudesmia</i>	17	<i>Quadraria</i>	11	-
		<i>Apicaria</i>	6	-
<i>Gaubea</i>	2	<i>Curtisaria</i>	2	-
<i>Idiogenes</i>	1	<i>Gymparia</i>	1	<i>cloeziana</i>
<i>Monocalyptus</i>	120	<i>Hesperia</i>	17	-
		<i>Renantheria</i>	103	<i>fastigata, marginata, muellerana, pilularis, regnans, sieberi</i>
<i>Symphyomyrtus</i>	378	<i>Tingleria</i>	1	-
		<i>Transversia</i>	19	<i>deanei, grandis, resinifera, robusta, saligna, urophylla, pellita, scias</i>
		<i>Bisectaria</i>	122	<i>cladocalyx, gomphocephala, spathula</i>
		<i>Dumaria</i>	38	<i>parviflora</i>
		<i>Exsertaria</i>	38	<i>alba, brassiana, camaldulensis, exerta, tereticornis</i>
		<i>Maidenaria</i>	75	<i>dalrympleana, gunii, globulus, pulverulenta, nitens, viminalis, urnigera</i>
		<i>Adnataria</i>	84	<i>albens, crebra, leucoxylon, melliodora, microcorys, paniculata, sideroxylon</i>
		<i>Sebaria</i>	1	-
<i>Telocalyptus</i>	4	<i>Hovittaria</i>	1	-
		<i>Equatoria</i>	3	<i>E. deglupta</i>

Compte tenu de la révision permanente du genre, cette classification des espèces est donnée à titre indicatif

Le bois d'eucalyptus, souvent scié sur place (figure 6), fournit des produits divers utilisés par les particuliers et la petite industrie (bois équarris, poteaux, traverses de chemin de fer). D'autres usages, plus récents et à plus haute valeur ajoutée, sont apparus tels que la construction immobilière, l'ameublement, la menuiserie, l'agencement intérieur ou encore la production de placages décoratifs (figures 7 et 8). Le développement de la valorisation des bois d'eucalyptus est le résultat direct des travaux de la recherche appliquée menée notamment en Australie. Entre 10 et 15% des volumes en bois d'eucalyptus sont utilisés par l'industrie dont 5 à 7% pour le bois d'œuvre, essentiellement en sciage (Bouvet 1999).

Depuis une dizaine d'année, de nombreux pays s'orientent vers la production de bois d'œuvre à partir d'eucalyptus (figure 9). *E. delegatensis*, *E. obliqua* et *E. regnans* sont commercialisés dans l'hémisphère Nord sous la dénomination commune de « Tasmanian Oak » (chêne de Tasmanie). *E. marginata* (Jarrah) et *E. diversicolor* (Karri) sont importés d'Australie en Europe. Si autrefois, le marché concernait le bois issu des forêts naturelles, actuellement le commerce repose sur les bois de plantations. En zone d'introduction, comme au Chili, le bois d'*E. globulus* est commercialisé sous l'appellation « Chilian Oak » (Gérard et Baillères 1999).

En dehors des utilisations déjà mentionnées, les eucalyptus permettent diverses valorisations. Les huiles, extraites à partir des feuilles, entrent dans les procédés de fabrication industrielle de médicaments pour la protection de la peau, contre certaines atteintes respiratoires, de parfums, d'additifs chimiques, *etc.* Ils assurent aussi l'approvisionnement en produits secondaires : production de miel, de tanins, de régulateurs de croissance (phytohormones), d'insecticides agricoles, de fongicides, d'adhésifs (à partir de l'écorce) et de compléments alimentaires pour l'élevage (Davidson 1995).

2.2. PRESENTATION GENERALE DES EUCALYPTUS

2.2.1. Organisation évolutive du genre *Eucalyptus*

Le genre *Eucalyptus* l'Hér. est l'un des 127 genres répertoriés de la famille des Myrtacées. Le nombre d'espèces et la structuration du genre sont en constante révision et il est difficile de présenter succinctement ce genre. Il comprend plus de 700 espèces, regroupées en sous-genres, sections, séries et sous-séries d'inégales importances (tableau 2). D'un point de vue taxonomique, les études phylogénétiques basées sur l'utilisation des marqueurs moléculaires du génome cytoplasmique sont maintenant associés aux marqueurs botaniques classiques (Davidson 1995, Steane et Byrne 1998, Vigneron 2000).

Le nombre de chromosomes, identique chez toutes les espèces, est de $2n = 22$. Le génome, de taille modeste, est à peine quatre fois plus gros que celui d'*Arabidopsis thaliana*, 150Mb pour 600Mb pour *E. grandis*. A titre de comparaison, celui du chêne (*Quercus robur*) est de 900Mb et celui du pin (*Pinus pinaster*) atteint 24000Mb (Plomion 1999).

L'analyse des 520 combinaisons hybrides naturelles répertoriées (Meskinen et Franklin 1984, Griffin *et al.* 1988) alimente la réflexion quant à la validité de la classification taxonomique et à l'importance des barrières génétiques interspécifiques. Toutefois, la fréquence des hybridations naturelles reflète assez bien la proximité systématique des différents taxons. Les huit sous-genres sont strictement isolés, ce qui est confirmé par l'échec des pollinisations contrôlées. Les croisements entre les sections sont assez rares, excepté dans les sous-genres *Monocalyptus* et *Symphomyrtus*. Ceci tendrait à montrer que le découpage en sections n'a pas la même signification biologique dans tous les sous-genres. Les hybridations inter séries et intra séries sont les plus fréquentes (Vigneron et Bouvet 1997) et leurs succès ou leurs échecs alimentent la réflexion sur la notion de limite d'espèce.

La compatibilité génétique, nécessaire, n'est pas la condition suffisante à l'apparition d'hybrides naturels : une étroite proximité spatiale, une coïncidence, au moins partielle, des périodes de floraison, un ou plusieurs agents pollinisateurs communs sont indispensables. Ces conditions expliquent, en partie, la relative rareté des types hybrides par rapport à la dizaine de milliers de combinaisons théoriquement possibles. La mise au point des techniques de croisements contrôlés (Pryor 1951 cité par Bouvet 1982) associée à la possibilité de conserver le pollen à -20°C , plus d'une année, ont toutefois amélioré les possibilités de production d'hybrides interspécifiques.

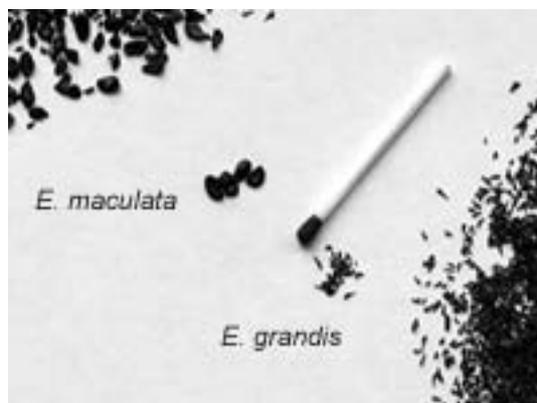


Figure 10. Variabilité interspécifique de la taille des graines d'eucalyptus

2.2.2. Caractéristiques et spécificités du sous-genre *Symphomyrtus*

Le sous-genre *Symphomyrtus*, auquel appartient l'essentiel des eucalyptus cultivés, représente, de loin, le groupe le plus important tant du point de vue du nombre d'espèces (plus de 550 selon certaines classifications) que de la diversité des formes ou des habitats occupés (Davidson 1995). Le travail des botanistes australiens demeure important et de nouvelles espèces sont encore décrites. Composé de huit sections, le sous genre *Symphomyrtus* est celui pour lequel les relations entre espèces sont les mieux connues.

Le confinement géographique des sections *Bisectaria* et *Dumaria* entraîne leur isolement génétique, bien que les échanges entre ces deux sections restent possibles dans l'extrême sud-ouest du continent. Les soixante-dix espèces de la section *Adnataria* couvrent l'aire géographique la plus étendue et s'hybrident à des degrés divers, mais toujours très faiblement, avec quatre des autres sections : *Bisectaria*, *Dumaria*, *Exsertaria* et *Maidenaria*. Cette section apparaît donc génétiquement relativement isolée.

Le groupe au sein duquel les échanges sont les plus intenses, auquel appartiennent les quatre espèces principales, est constitué des sections *Maidenaria* (*E. globulus*), *Transversaria* (*E. grandis*) et *Exsertaria* (*E. camaldulensis*, *E. tereticornis*), qui présentent des caractéristiques agronomiques complémentaires. Les flux géniques intra section sont importants. Toutes les espèces n'y participent pas, mais il est probable que les barrières génétiques qui les isolent puissent être mises en défaut, au moins partiellement, par des manipulations simples de croisements contrôlés (Vigneron et Bouvet 1997).

2.3. BIOLOGIE DES EUCALYPTUS

2.3.1. Généralités

2.3.1.1. Des graines jusqu'à la plantation

Les graines d'eucalyptus sont très petites et ne présentent pas de dormance. Leur nombre au kilogramme varie de 150.000 pour *E. maculata* à 14 millions pour *E. deglupta* (figure 10). Elles germent dès que les conditions favorables de température et d'humidité sont réunies. Elles se conservent cependant, en chambre froide, plusieurs années sans baisse notable du pouvoir germinatif. Leur abondance et leur taille constituent de réels atouts pour la dissémination (Boland

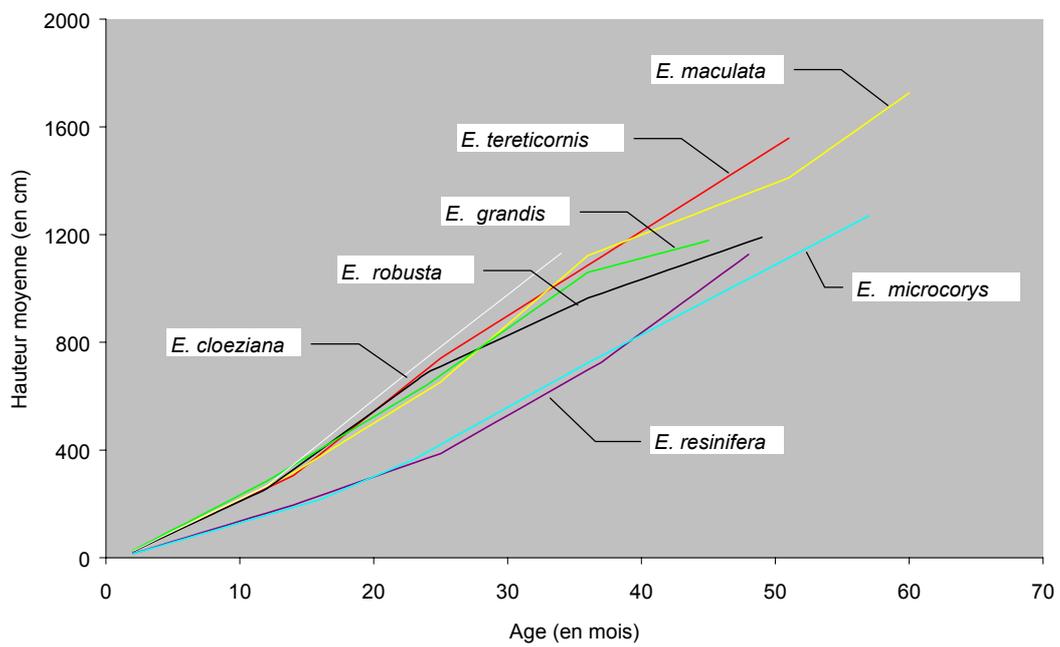


Figure 11. Croissance en hauteur de sept espèces d'eucalyptus à Madagascar - Station de Mahela

1987). En revanche, les graines étant quasiment dépourvues de réserve, les plantules doivent rapidement trouver les éléments nutritifs nécessaires à leur croissance.

La production de plants en pépinière est délicate à réaliser. Les graines sont semées, à la volée, sur des planches de semis spécifiques (substrat filtrant et très fin). Les fontes de semis sont fréquentes et il convient d'effectuer de fréquents traitements fongiques. Les plantules, au stade 4 à 6 feuilles (1-1,5 mois après le semis), sont repiquées en pot. Le milieu de repiquage et le mode d'élevage des jeunes plants dépendra des spécificités du milieu et des moyens alloués. La plantation est effectuée en pleine terre, labourée ou non, en début de saison des pluies.

2.3.1.2. Potentialités de croissance

Les eucalyptus ne forment pas de bourgeons dormants protégés. L'apex produit, en continu, de nouvelles paires de feuilles et la croissance est indéfinie. Lorsque l'apex est détruit, un bourgeon axillaire prend immédiatement le relais, la croissance ne se trouvant ainsi que temporairement ralentie. En cas de défaillance du bourgeon axillaire, le bourrelet de tissu méristématique situé à sa base est capable de développer de nouvelles pousses, le remplacement des axes est donc perpétuellement assuré. Ces caractéristiques confèrent à la plupart des espèces un fort potentiel végétatif mis à contribution après un incendie, un gel ou l'exploitation humaine. Il offre la possibilité d'une conduite des peuplements en taillis, en assurant un renouvellement régulier et efficace de l'appareil aérien (Pryor 1976).

Les eucalyptus sont caractérisés par une croissance juvénile forte (3-5 mètres par an à Madagascar sans intrant, 7 mètres par an au Congo avec intrants) qui leur confère une aptitude particulière à l'installation de peuplement (figure 11). C'est d'ailleurs, avec la productivité des plantations et les caractéristiques du bois, les principaux critères qui ont fait leur succès mondial. Les essais, mis en place dans la région d'étude de Moramanga dans les années 1980, ont montré le potentiel d'*E. grandis*. Sur les stations les plus fertiles (Périnet et Sandrangato), la hauteur moyenne atteint 45 mètres et la production moyenne est de 70 à 80 m³ha⁻¹an⁻¹ à 14 ans. La croissance est nettement plus faible sur les sols moins riches, elle tombe à quelques mètres cubes par hectare. Le choix des provenances est primordial surtout lorsque les conditions de fertilité sont défavorables (Bouvet et Andrianiriana 1990).

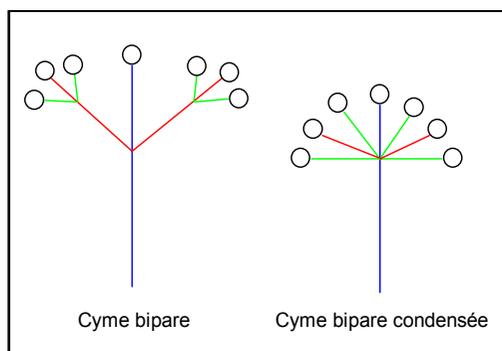


Figure 12. Architecture de l'inflorescence de l'*E. grandis*



Figure 13. Rameau florifère d'*E. grandis*



Figure 14. Pollinisation, par les abeilles, des fleurs d'eucalyptus

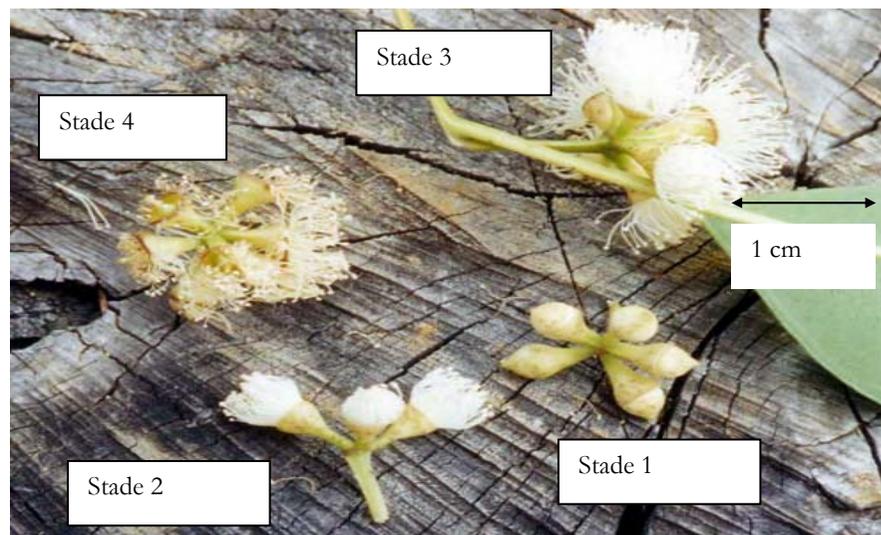


Figure 15. Les différents stades floraux pour *E. grandis*

2.3.2. Biologie de la reproduction

Dans l'aire naturelle, la biologie de la reproduction des eucalyptus est faiblement documentée. Les études n'ont porté que sur quelques espèces d'intérêt commercial dont les besoins en graines de qualité, par exemple, sont importants et stratégiques comme *E. delegatensis* (Moran et Brown 1980), *E. grandis* (Martins-Corder et Lopes 1997, Junghans *et al.* 1998), *E. pellita* et *E. scias* (House et Bell 1996), *E. regnans* (Griffin *et al.* 1987, Griffin et Cotteril 1988) ou *E. urophylla* (House et Bell 1994, Hardner et Potts 1995, Hardner *et al.* 1996).

D'autres travaux concernent les espèces ayant une aire de répartition restreinte et posant des problèmes liés à la conservation des ressources génétiques en peuplement naturel : *E. rameliana* (Sampson *et al.* 1995), *E. parvifolia* (Prober *et al.* 1990), *E. paliformis* (Prober *et al.* 1990), *E. pulverulenta* (Peters *et al.* 1990), *E. spathulata*, *E. cladocalyx* et *E. leptophylla* (Ellis et Sedgley 1992) ou à des problèmes phytosanitaires chez *E. marginata* (Millar *et al.* 2000).

Les observations directes de la floraison (durée de floraison, biologie florale, cycle phénologique, *etc.*) sont réalisées pour les besoins des travaux de croisements interspécifiques en pollinisation contrôlée (Griffin 1980, Griffin *et al.* 1988, Law *et al.* 2000). Il n'existe pas de travaux consacrés à la comparaison de la biologie de la reproduction dans l'aire naturelle et en zone d'introduction.

2.3.2.1. Biologie florale

Chez les eucalyptus, les inflorescences présentent différents degrés d'expansion, d'agrégation ou de compaction des fleurs. L'inflorescence unitaire est généralement appelée ombelle, bien qu'il s'agisse d'une cyme bipare condensée où les axes intermédiaires sont totalement réduits (figure 12). Le nombre de fleurs par inflorescence peut varier de 3 à 15 d'une espèce à une autre. Chez *E. grandis*, les inflorescences sont simples et axillaires, constituées par 7 fleurs (figure 13).

La fleur bisexuée et apétale des eucalyptus est adaptée à la pollinisation entomophile sans qu'il existe une spécificité entre l'insecte et la fleur. Celle-ci porte de nombreuses étamines, portées par un staminophore, qui lui donnent sa couleur jaune crème, et des nectaires (figures 14 et 15). L'ovaire est du type infère surmonté par le style. Le nombre d'ovules est variable dans le genre : de quelques dizaines chez *E. fastigata* (Boland et Sedgley 1986, Sedgley *et al.* 1989), *E. sieberi* et *E. nitens* (Tibbitts 1989) à quelques centaines chez *E. alba*, *E. woodwardii*, *E. camaldulensis* (Sedgley et Smith 1989, Moncur *et al.* 1995). Les ovules sont de deux sortes : il y a d'une part des

ovules fertiles et d'autres part des ovulodes non fonctionnelles. Les tubes polliniques ne pénètrent pas les ovulodes (Sedgley *et al.* 1989). Leur fonction est encore obscure et leur structure diffère d'une espèce à l'autre. Leur disposition est un caractère utilisé en taxonomie (Carr et Carr 1962). Les ovules sont répartis dans 3 à 5 loges, appelées locules, disposées sur une ou deux rangées selon les espèces. Le nombre de locules est variable à l'intérieur d'une même espèce alors que le nombre d'ovules reste généralement stable.

2.3.2.2. Pollinisation

Les productions abondantes de pollen et de nectar rendent les arbres en floraison attractifs pour de nombreux insectes. Les insectes pollinisateurs sont très variés : petits coléoptères, diptères, hyménoptères, lépidoptères, hémiptères (Hodgson 1976a, Pryor 1976) et l'abeille domestique, *Apis mellifera*, le plus fréquent. Ce mode de pollinisation, associé à une protandrie bien marquée, favorise l'allogamie sans exclure le croisement entre fleurs d'un même individu (geitonogamie). Quelques espèces d'eucalyptus sont visitées par de petits oiseaux ou de petits mammifères (Sampson *et al.* 1995).

En Afrique du Sud, comme dans d'autres pays, *E. grandis* est une espèce mellifère (Loock 1970, Moncur *et al.* 1995, Davis 1997). L'apiculture favorise ainsi la pollinisation par les abeilles domestiques (Moncur *et al.* 1993, 1995). La composition du nectar des eucalyptus est plus riche en hexoses (glucose et fructose) qu'en saccharose (85%/15%). Les abeilles domestiques sont attirées préférentiellement par les espèces produisant ce type de nectar (Davis 1997). Le comportement des abeilles domestiques est relativement bien documenté. Leur présence favorise les rendements grainiers mais leur efficacité sur le brassage génétique n'a pas été étudiée. Elles sont généralement sélectives sur le type de fleurs (couleur, odeur, *etc.*) et leurs visites se confinent souvent à un arbre et ses proches voisins (Moncur *et al.* 1995, Jackson 1996, Davis 1997). L'origine du pollen récolté sur leur corps confirme qu'elles ont un comportement grégaire, elles exploitent la ressource et y reviennent tant qu'elle est suffisante. Néanmoins, les échanges de pollen à l'intérieur des ruches conduisent à l'observation de distances de pollinisation de plusieurs kilomètres (Vaissière *et al.* 1996). A l'opposé, les visites des abeilles sauvages sont plus aléatoires et elles transportent simultanément du pollen de plusieurs espèces (Free et Williams 1972).

L'anthèse précède la réceptivité du stigmate de 5 jours chez *E. grandis* et jusqu'à 15 jours pour *E. regnans* mais cette durée varie beaucoup en fonction des conditions écologiques (Hodgson

1976b, Sedgley *et al.* 1989). La réceptivité du stigmate est synchrone avec l'apparition de la pigmentation de la zone nectarifère. Les grains de pollen ne germeront qu'au moment de la sécrétion d'exsudat produit par le stigmate lors de sa période de réceptivité. Les tubes polliniques se propagent entre les cellules du tissu de transmission (Sedgley *et al.* 1989, Sedgley et Smith 1989). Le nombre de fleurs fécondées par inflorescence doit être suffisant pour qu'elles se maintiennent jusqu'à la maturité des fruits. Le délai entre la germination du pollen et la fécondation proprement dite varie, selon les espèces, de 24 heures à une semaine (Sedgley *et al.* 1989). Après la fécondation, une zone d'abscission apparaît à la base du style et juste après, celui-ci se détache de la fleur.

Les mécanismes limitant l'autofécondation sont différents d'une espèce à l'autre. Ils interviennent à différents niveaux situés entre la croissance des tubes polliniques dans le style et la maturité de la graine. Sur *E. regnans*, Sedgley *et al.* (1989) n'ont pas observé de différences, jusqu'à 16 semaines, dans le développement des embryons et de l'endosperme entre les croisements issus d'autofécondation ou d'allofécondation. Une autre étude a montré que la pénétration des tubes polliniques dans les ovules est réduite en autofécondation (Sedgley et Smith 1989). Pour d'autres espèces, la compétition entre les tubes polliniques peut limiter la proportion d'autopollen dans le style (Boland *et al.* 1987). En revanche, aucun résultat ne montre d'auto-incompatibilité stigmatique. Les mécanismes post-zygotiques limitant le nombre d'individus autofécondés sont peu documentés. Il s'agirait plus d'une compétition pour les ressources entre embryons puisque la proportion d'individus issus d'autofécondation par capsule décroît avec le temps (Hardner et Potts 1995, Moran et Brown 1980). Sedgley et Smith (1989) ont montré que l'autopollen entraînait une forte chute des fleurs après la pollinisation. Au final, il ne restait que 10% des fleurs pollinisées par de l'autopollen comparé aux 30% en allogamie.

2.3.2.3. Production grainière

L'aptitude à produire des graines, régulièrement et en quantité suffisante, constitue un des critères principaux pour le développement d'une espèce en reboisement. L'âge d'entrée en production est très variable d'une espèce à une autre (Florence 1996, Cremer 1971) : de 2-3 ans pour certaines espèces (*E. tereticornis*) il peut aller à plus de 25 ans pour d'autres (*E. regnans*). Mis à part quelques espèces comme *E. grandis* qui fructifient régulièrement, il y a souvent une alternance entre une bonne année de fructification et une ou plusieurs années de faible production (Setterfield et Williams 1996).

Tableau 3. Comparaison, chez les eucalyptus, du nombre de graines par capsule en fonction du type de croisement

Espèce	Graines viables par capsule				Sources
	Nb d'ovules	Pollinisation libre	Auto-pollinisation	Pollinisation croisée	
<i>E. alba</i>	160	6,0 (3-11)	1,0	22,0	Moncur <i>et al.</i> 1995
<i>E. albens</i>	-	2,0 (0,1-4,4)	-	-	Burrows 1995
<i>E. bicostata</i>	-	7,6	-	13,5	Moncur <i>et al.</i> 1995
<i>E. camaldulensis</i>	130	13,0 (4-27)	-	-	Moncur <i>et al.</i> 1995
<i>E. camaldulensis</i>	-	-	-	55 (maximum)	Oddie et McComb 1998
<i>E. camaldulensis</i>	179	25	-	-	Doran et Burgess 1993
<i>E. cladocalyx</i>	57	-	0,5	1,6	Ellis et Sedgley 1993
<i>E. delegatensis</i>	38	3,3	-	-	Boland et Martensz 1981
<i>E. fastigata</i>	17	2,4 (1-5)	-	-	Moncur <i>et al.</i> 1995
<i>E. globulus</i>	-	15 (10-20)	-	38,0	Volker <i>et al.</i> 1990
<i>E. grandis</i>	-	5,8 (2-16)	2,4 (0-10)	30,7 (1-68)	Hodgson 1976a
<i>E. grandis</i>	-	-	0,2	3,0	Moncur <i>et al.</i> 1995
<i>E. grandis</i>	-	-	1,2	3,0	Hodgson 1976b
<i>E. gummifera</i>	36	1,2 (0-3)	-	-	Moncur <i>et al.</i> 1995
<i>E. leptophylla</i>	33	-	0,8	2,7	Ellis et Sedgley 1993
<i>E. leucocylon</i>	-	5,7 (5-7)	1,2 (0-2)	-	Ellis et Sedgley 1993
<i>E. melliodora</i>	-	4,6 (1-17)	-	-	Burrows 2000
<i>E. nitens</i>	35	3,8	2,2	7,9	Tibbits 1989
<i>E. paniculata</i>	108	2,1 (0-8)	-	-	Moncur <i>et al.</i> 1995
<i>E. regnans</i>	-	4,1	2,6	4,2	Eldridge et Griffin 1983
<i>E. saligna</i>	159	1,8 (0-15)	-	-	Moncur <i>et al.</i> 1995
<i>E. spathulata</i>	40	-	1,2	9,2	Ellis et Sedgley 1992
<i>E. sieberi</i>	24	1,6 (0-4)	-	-	Moncur <i>et al.</i> 1995
<i>E. woodwardii</i>	250	-	6,8	18,2	Sedgley et Smith 1989

Trois mois après la fécondation, le fruit se développe en une capsule lignifiée. Les graines se détachent du placenta mais restent dans les loges obstruées par les valves. Le temps de maturation varie d'une espèce à une autre et il dépend des conditions climatiques. Dans l'aire naturelle, la maturation complète des fruits intervient 8 à 9 mois après la floraison soit de janvier à avril (Boland *et al.* 1987). A Madagascar, les récoltes se font classiquement en novembre-décembre (6-8 mois après la floraison) ce qui permet d'approvisionner les pépinières à cette période et de planter en janvier-février.

La qualité de la production grainière dépend de la population de pollinisateurs et de leur efficacité pollinisatrice, de la densité de plantation et des conditions climatiques pendant la floraison. On peut l'estimer via le nombre de graines produites par capsule. En pollinisation libre, celui-ci est gouverné par plusieurs facteurs : le nombre d'ovules fertiles, la quantité de pollen déposé sur le stigmate, la période du dépôt, l'origine du pollen, le succès de la fécondation et les interactions entre les différents embryons. Les proportions d'ovules fertiles variant d'une espèce à une autre, on peut imaginer qu'en condition saturante en pollen (pollinisation contrôlée), le nombre de graines viables par capsule traduise le nombre maximum possible par rapport aux ressources allouées à leur développement. Pourtant, il est largement en deçà du nombre d'ovules présents par fleurs. D'une manière générale, en pollinisation libre, le nombre de graines viables par capsule est faible par rapport au nombre de tubes polliniques atteignant les ovules (Sedgley et Smith 1989). Au final, le nombre de graines viables par fruit va de quelques unités à 2 ou 3 dizaines (tableau 3). Ces résultats sont caractéristiques des *Myrtaceae* (Beardsell *et al.* 1993). Les variations entre les capsules sont importantes puisqu'on trouve des minima proches de zéro et des maxima jusqu'à 25-30 graines par capsule. Pour une espèce donnée, la production grainière va principalement dépendre de l'origine du pollen (auto- ou allopollen). Selon les espèces, le rapport entre le nombre de graines produit en allofécondation et celui obtenu en autofécondation est de deux à plus de dix.

Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer les différences entre le nombre de graines produites en pollinisation libre et le nombre d'ovules :

- la quantité de pollen déposée sur le stigmate est limitante ;
- la proportion d'ovules non fertiles est importante, elle est, par exemple, de 46% chez *E. regnans* (Sedgley *et al.* 1989) ;
- le taux d'autopollen n'est pas négligeable et conduit à une perte de production en graines du fait des mécanismes d'auto-incompatibilité ;

- les grains de pollen d'origines différentes et les embryons produits sont en compétition conduisant à la réduction du nombre de graines viables dans les capsules (Mitchell 1997, Cowan *et al.* 2000, Quesada *et al.* 2001).

Chez *E. grandis*, la production moyenne, en pollinisation libre, se situe aux alentours de 6 graines viables par capsules (Hodgson 1976b) correspondant à la taille relativement petite des capsules. La quantité de graines au kilogramme est de 1-1,5 millions, les fruits demeurent non déhiscents tant qu'ils ne sont pas détachés de la branche et peuvent rester jusqu'à deux à trois années sur l'arbre. Les graines ne sont dispersées que par le simple effet de la pesanteur et très peu de graines sont dispersées au-delà d'une distance égale à deux fois la hauteur de l'arbre considéré (Boland *et al.* 1987, Florence 1996).

2.3.3. Facteurs environnementaux influençant la floraison et la fructification

L'aire d'origine est située essentiellement dans l'hémisphère sud. Selon les zones climatiques où elles se trouvent, les espèces se classent en deux groupes respectivement constitués par celles qui fleurissent de mars à août correspondant à l'hiver austral et de novembre à février correspondant à l'été austral. A Madagascar, la période de floraison de l'*E. grandis* va d'avril à septembre durant l'été austral. La saison peut être plus ou moins décalée selon les années et l'altitude.

Les mécanismes de floraison (précocité, durée, protandrie, maturation des fruits) sont influencés par les températures qui règnent durant la période de développement des boutons floraux (Florence 1996). Les premières floraisons interviennent plus ou moins tôt d'une année à l'autre. A Madagascar, les premières floraisons apparaissent au mois de mars en zone de basse altitude et au mois de mai en haute altitude (1300-1500 mètres). La protandrie est de 3-4 jours à Pointe Noire (Congo) au niveau de la mer (Bouvet 1982). Elle est de l'ordre de 5-6 jours à Madagascar à 900 mètres d'altitude. La durée de maturation des fruits est également différente dans les deux sites. Au Congo, 3 à 4 mois suffisent alors qu'à Madagascar cette durée passe à 5-6 mois (Chaix et Rakotonjanahary 1996). Toutes ces observations ont été effectuées dans le cadre des travaux de croisements contrôlés effectués dans ces deux pays. Nul doute que ces variations expriment un comportement moyen des génotypes et que la variabilité individuelle est élevée.

D'autres types de facteur interviennent, qu'ils soient liés à l'environnement ou aux caractéristiques intrinsèques de l'espèce. Il s'agit d'événements défavorables (sécheresse, froid, feu) sur la production de fleurs ou de pollen (*E. regnans* : Griffin 1980) jusqu'à des problèmes de stérilité mâle (*E. pulverulenta* : Peters *et al.* 1990, *E. leucoxylon* : Ellis et Sedgley 1993, *E. grandis* : Campinhos *et al.* 1997). Ce dernier aspect constitue un avantage dans le cadre de la production d'hybrides interspécifiques en pollinisation libre. La présence d'insectes parasites, néfastes à la floraison, en pondant par exemple sur les fleurs, ou prédateurs d'insectes pollinisateurs, peut entraîner également des perturbations dans la reproduction d'une espèce à l'image de l'impact de certaines mouches sur *E. grandis* en Afrique du Sud (Herrmann 1984).

2.3.4. Particularités et conséquences du régime de reproduction

2.3.4.1. Caractéristiques du régime de reproduction

Les variations du taux d'autofécondation des eucalyptus sont élevées (Phillips et Brown 1977, Moran et Brown 1980, Brown *et al.* 1985, Peters *et al.* 1990, Moran 1992, House et Bell 1994, Moncur *et al.* 1995, Sampson *et al.* 1995, Sampson 1998). Il dépend du stade de développement du matériel végétal pris en compte (graines, plantules ou plants adultes), du niveau d'auto-incompatibilité spécifique ou individuelle, de l'espèce, du type de population (peuplement naturel ou artificiel) et de la densité du peuplement. Le taux d'autofécondation moyen sur le genre est de 24%.

Chez *E. delegatensis*, Moran et Brown (1980) ont observé, à partir de graines, des variations du taux d'autofécondation selon la durée de leur stockage. Il était de 34, 22 et 15% pour trois lots de graines récoltés trois années consécutives dans la même population. A partir de plantules d'*E. pellita*, House et Bell (1996) ont déterminé des taux d'autofécondation compris entre 27 et 55% selon les populations. Les variations individuelles peuvent être très importantes. Hardner et Potts (1995) ont montré, chez *E. globulus*, que le taux individuel d'autofécondation allait de 0 à 74%. Griffin *et al.* (1987) ont obtenu, à partir de graines, un taux d'autofécondation de 44% en pollinisation libre chez *E. regnans*. En pollinisation contrôlée, le mélange autopollen et allopollen en proportion 1 : 1 a donné, au final, un taux d'autofécondation de 20%. A partir de plantules d'*E. globulus*, Hardner *et al.* (1996) ont observé un taux moyen d'autofécondation nul en peuplement fermé et de 0,52 pour des arbres isolés distants entre eux d'au moins 100 mètres.

Tableau 4. Estimation de la dépression consanguine (%) chez les eucalyptus sur le taux de survie, la production grainière et les caractères de croissance

Caractère	Age (ans)	<i>E. grandis</i>	<i>E. regnans</i>	<i>E. nitens</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. gunnii</i>	<i>E. tereticornis</i>
Production grainière	-	87 (auto vs allo) ¹		72 (auto vs allo) ¹²	84 * (auto vs allo) ⁸ 74 * (auto vs allo) ⁵	73 (auto vs allo) ¹³	
Taux de survie	9 12		26 (auto vs libre) ³ 57 (auto vs libre) ³				
Hauteur	1 1,5 2 4 9 12	38 ** ¹ 30 (auto vs allo), 21 (auto vs libre), 12 (libre vs allo) ¹¹	10 (auto vs allo) ⁹ 22 (auto vs allo) ⁹ 17 (auto vs allo) ⁹ 11 (auto vs allo) ⁹ 10 (auto vs libre) ³ 12 (auto vs libre) ³	27 ** (auto vs allo) ⁴ 28 *** (auto vs allo) ⁴ 14 ** (auto vs allo) ⁴	17 * (auto vs allo) ⁵ 22 * (auto vs allo) ⁵ 26 * (auto vs allo) ⁵	13 *** ⁶	25 (auto vs allo), 12 (auto vs libre) ¹⁰
Diamètre	1 2 4 7 9 12		18 (auto vs allo) ⁹ 20 (auto vs libre) ³ 16 (auto vs libre) ³	22 ** (auto vs allo) ⁴ 24 ** (auto vs allo) ⁴ 28 ** (auto vs allo) ⁴	19 ns (auto vs allo) ⁵ 21 * (auto vs allo) ⁵ 24 * (auto vs allo) ⁵		
Surface terrière	4		50 * (auto vs allo) ⁵	37 ** (auto vs allo) ⁴			
Volume	2 3 4	57 * (auto vs allo) ²	37 * (auto vs allo) ⁹	40 ** (auto vs allo) ⁴	17 (libre vs allo) ⁷ 48 * (auto vs allo) ⁵ 23 * (libre vs allo) ⁵ 48 * (auto vs allo) ⁸ 22 * (libre vs allo) ⁸		

(n.s., *, **, *** : non significatif au seuil de 5%, significatif au seuil de 5, 1, 0,1%, auto : autofécondation, allo : allofécondation, libre : pollinisation libre),

¹⁾ Hodgson 1976c, ²⁾ Van Wyk 1981, ³⁾ Eldridge et Griffin 1983, ⁴⁾ Hardner et Tibbits 1998, ⁵⁾ Hardner et Potts 1995, ⁶⁾ Potts *et al.* 1987, ⁷⁾ Hodge *et al.* 1996,

⁸⁾ Hardner *et al.* 1998, ⁹⁾ Griffin et Cotterill 1988, ¹⁰⁾ Sidhu et Singh 1996, ¹¹⁾ Hodgson 1976b, ¹²⁾ Tibbits 1989, ¹³⁾ Potts et Savva 1989

En verger à graines ou en plantation, ce taux diminue aux alentours de 10% (Ellis et Sedgley 1993, Campinhos *et al.* 1998, Junghans *et al.* 1998). A partir de plantules provenant de graines récoltées dans un essai brésilien d'*E. urophylla*, Gaiotto *et al.* (1997) ont révélé 10% d'autofécondation. Yeh *et al.* (1983) ont déterminé un taux de 15% dans un verger à graines d'*E. citriodora*. A partir de plantules d'*E. regnans*, Moran *et al.* (1989) ont comparé un peuplement naturel et un verger et obtenu respectivement un taux d'autofécondation de 26% et de 9%. Au Brésil dans un verger à graines de clones d'*E. grandis*, Sato et Mori (1996) ont observé un taux de 13%.

2.3.4.2. Effets de la dépression consanguine chez les eucalyptus

Les différents types de croisements consanguins, autofécondation, croisement entre plein-frères, demi-frères, *etc.*, conduisent globalement à une perte de « fitness » (production de graines viables, croissance en hauteur et accès à la lumière). Le système mixte de reproduction des eucalyptus aboutit à la présence d'individus issus d'autofécondation dans les descendances produites en pollinisation libre. Chez les eucalyptus, dès les premières générations, la dépression consanguine s'exprime à plusieurs stades du développement des arbres. La plupart des études traitant de la consanguinité s'appuie sur la comparaison d'individus issus de pollinisation libre ou de croisements contrôlés en autofécondation et en allofécondation (tableau 4).

Le nombre de graines viables par capsule, obtenues par autofécondation, varie en fonction de l'espèce et des individus. A ce niveau, la dépression due à l'autofécondation est largement documentée, elle s'exprime globalement par une diminution du pouvoir reproducteur : 10% pour *E. urophylla* (Eldridge 1978), de l'ordre de 50% pour *E. urnigera*, *E. regnans* mais avec des variations individuelles entre 7 et 47% (Griffin *et al.* 1987, Potts et Savva 1989, Sedgley *et al.* 1989), aux alentours de 70% pour *E. gunnii*, *E. nitens*, *E. globulus* et *E. ovata* (Potts et Savva 1989, Tibbits 1989, Hardner et Potts 1995), et enfin 90% pour *E. grandis*, *E. morrisbyi* et *E. woodwardii* (Hodgson 1976c, Potts et Savva 1989, Sedgley et Smith 1989). En dehors des aspects quantitatifs, Hodgson (1976b) a observé un accroissement du nombre de plantules anormales Il en distingue 15 types pour *E. grandis*, qui vont des plantules albinos à celles possédant 3 cotylédons ou présentant des feuilles anormales.

L'effet de l'autofécondation sur le taux de mortalité au champ, après plantation, dépend de l'espèce et de l'âge des plants. Hardner et Potts (1995) comme Hardner et Tibbits (1998) n'ont

pas mis en évidence de différence chez *E. globulus* jusqu'à 43 mois et chez *E. nitens* jusqu'à 9 ans. Pour *E. regnans*, Eldridge et Griffin (1983) ont observé des différences significatives au-delà de 5 ans soit un taux de mortalité de 22, 26 et 57% respectivement à 5, 9 et 12 ans et demi. Pour cette même espèce à 10 ans, Hardner et Potts (1997) ont obtenu un taux de mortalité de 62% pour les individus autofécondés et de 40% pour ceux issus d'allogamie. Potts *et al.* (1987) ont mis en évidence des différences significatives à la pépinière et dès la première année au champ sur *E. gunnii*. Hardner et Potts (1995) comme Moran et Brown (1980) ont suggéré qu'il existe, en pollinisation libre, une contre-sélection des individus consanguins pendant la période post-zygotique.

Les effets dépressifs liés à la consanguinité s'expriment également sur les caractères de croissance (hauteur, diamètre, surface terrière, volume) et apparaissent assez tôt. Ils ont été observés dès la première année pour *E. globulus*, *E. grandis*, *E. gunnii* et *E. nitens* (Hodgson 1976c, Wyk 1977, Wyk 1981, Potts *et al.* 1987, Hardner et Potts 1995, Hardner et Tibbits 1998) ou plus tard à 20 mois pour *E. regnans* (Griffin et Cotteril 1988). Pour des plants d'*E. globulus* de 43 mois, la dépression consanguine atteignait 26% sur la hauteur, 24% sur le diamètre et 48% sur le volume. Chez *E. regnans*, les effets au même âge étaient moins importants : 11, 18 et 37% sur les mêmes caractères (Griffin et Cotteril 1988). Eldridge et Griffin (1983) n'ont pas observé d'augmentation de la dépression avec l'âge. Hardner et Potts (1995) ont expliqué les performances moyennes des individus obtenus en pollinisation libre par le fait qu'une part de ces individus provient d'autofécondation.

Les essais comparatifs de provenances, menés à Madagascar, ont montré que les variétés locales sont moins performantes que les provenances de l'aire d'origine. De plus ils montrent des défauts de branchaison caractéristiques des effets de la dépression consanguine (Bouvet et Andrianiriana 1990, Ranaivoson 1993).

Le coefficient de consanguinité après une génération est de 0,500, 0,250 et de 0,125 respectivement dans le cas d'autofécondation, de croisement entre plein-frères et entre demi-frères (Falconer 1974). Si l'on estime qu'il existe une relation linéaire entre la dépression consanguine et le coefficient de consanguinité, une augmentation d'un dixième de ce dernier entraînerait une baisse de 5 et de 10% respectivement sur la hauteur et le volume pour *E. globulus* (Hardner et Potts 1995). Des résultats similaires ont été obtenus sur *Pinus radiata* (Sedgley et Smith 1989), *Pinus elliottii* (Matheson *et al.* 1995) et *E. grandis* (Reddy *et al.* 1985). Durel *et al.*



Figure 16. Intégration de l'eucalyptus dans le paysage des hauts plateaux malgaches - Région Manjakandriana (Antananarive)



Figure 17. Plantation d'*E. grandis* sur les sols dégradés de Madagascar - Station de Mahela (Brickaville)

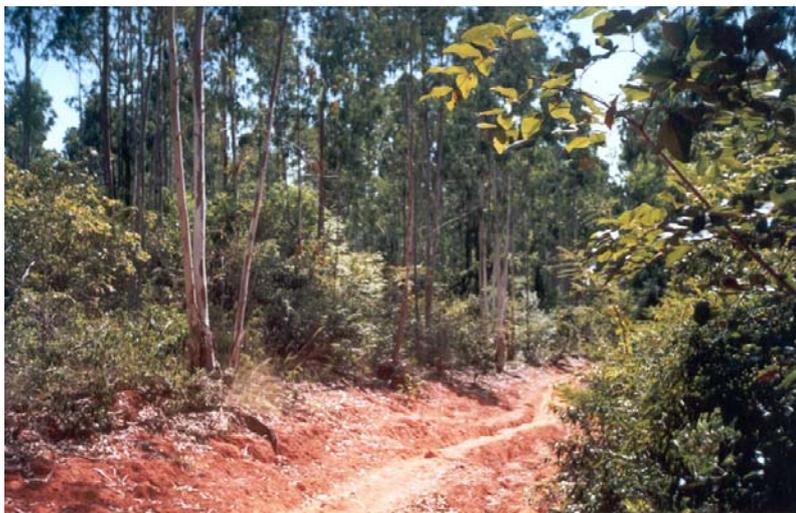


Figure 18. Régénération naturelle d'espèces locales sous un couvert d'eucalyptus - Région de Mangatsoa (Mahajanga)

(1996) ont observé sur *Pinus pinaster* un taux de dépression consanguine de 27% sur la hauteur, 37% sur la circonférence et 63% sur le volume pour un coefficient de consanguinité de 0,75. D'autres travaux chez *E. globulus* ont montré que 20% d'autofécondation au moins diminuait significativement les performances agronomiques à 4 ans (Hardner *et al.* 1996). Ce seuil serait de 40 % pour *E. grandis* au même âge (Burgess *et al.* 1996). Cette dernière espèce semble moins sensible aux effets de la dépression consanguine mais les résultats varient selon le type de matériel végétal étudié. Après une génération, Wyk (1981) a montré que les individus issus d'autofécondation et de croisement entre plein-frères présentaient des performances inférieures en croissance, respectivement de 40% et 15% par rapport aux individus provenant d'allofécondation. En revanche, il n'a pas mis en évidence d'effet pour les individus de croisement entre demi-frères.

De la pollinisation au jeune plant, la sélection naturelle n'est pas suffisante pour éliminer la totalité des individus consanguins. Celle-ci intervient encore lors de la compétition dans la régénération naturelle. Hardner et Tibbits (1998) estiment que les conditions expérimentales des essais au champ limitent les effets de compétition qui pourraient exister dans la régénération naturelle. Les individus issus d'autofécondation sont dans ces conditions moins soumis à la sélection et les effets de la dépression consanguine sont sous-estimés.

En conclusion, l'ensemble de la bibliographie s'accorde donc sur l'importance de la dépression consanguine chez les individus issus d'autofécondation. La contre-sélection de ces génotypes ($F=0,5$) affecte à des degrés divers, en fonction de l'espèce et très certainement du milieu, toutes les phases du développement depuis la fécondation jusqu'à l'âge adulte. Les individus plus faiblement consanguins, issus des croisements entre plein-frères et demi-frères par exemple, semblent beaucoup moins affectés, ceci probablement en raison de la très forte hétérozygotie existante.

2.4. SITUATION DES EUCALYPTUS A MADAGASCAR

Les eucalyptus, introduits à Madagascar depuis la fin du XIX siècle (Champsoloix 1961), sont omniprésents dans le paysage malgache, que ce soit sur les hautes terres, sur la côte humide de l'Est, dans les savanes de l'Ouest ou dans les zones arides du Sud (figures 16 et 17). Contrairement aux idées reçues, dans la plupart des cas, les plantations d'eucalyptus favorisent l'installation d'espèces locales en reconstituant une ambiance forestière (figure 18). Les

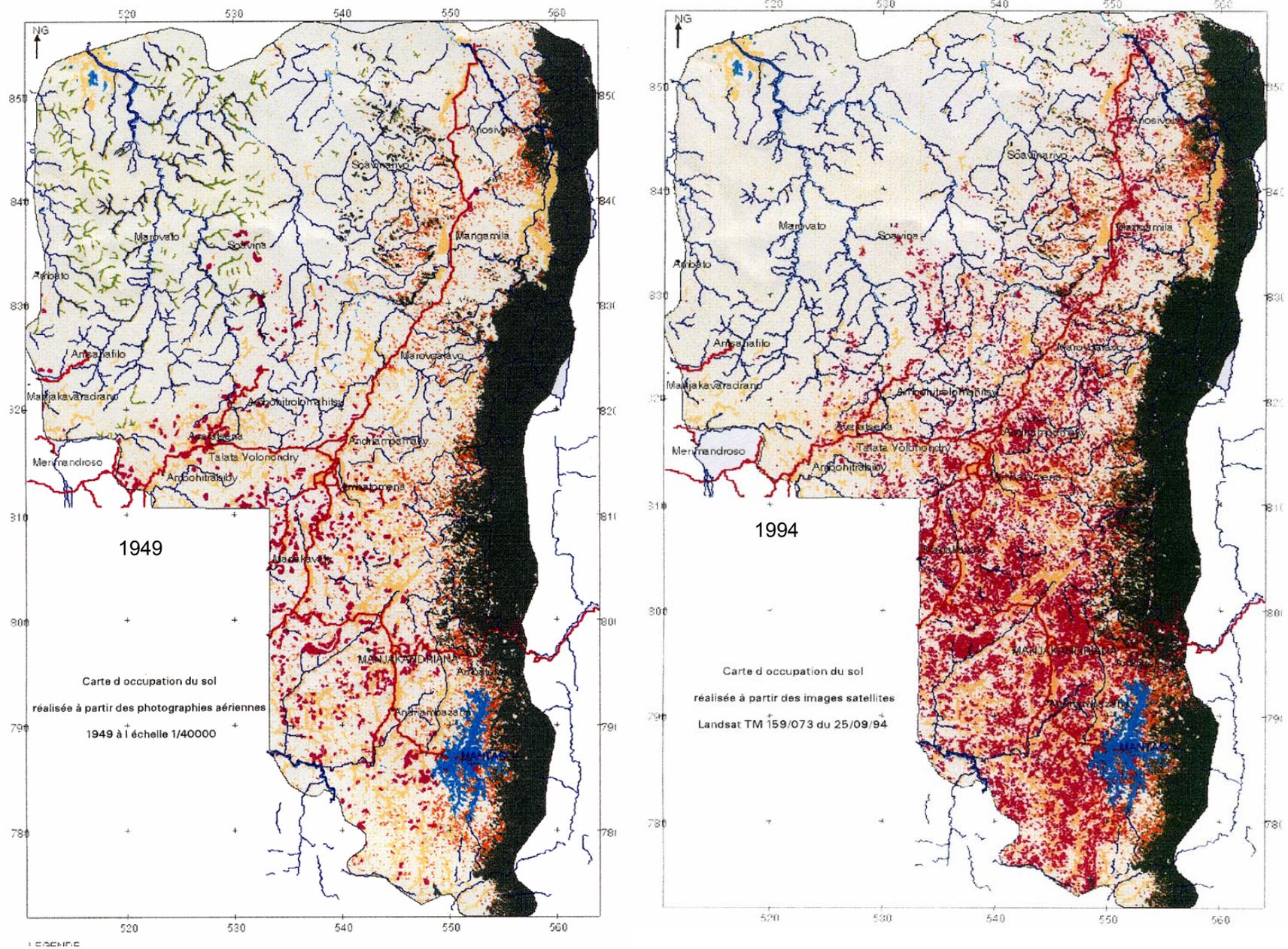


Figure 19. Extension, entre 1949 et 1994, des plantations d'eucalyptus au nord-est d'Antananarivo (en rose les parties concernées par les plantations d'eucalyptus)

plantations se sont étendues avec les besoins du chemin de fer, de l'industrie locale et des populations (Mouranche 1956, Randrianandianina 1971, Bertrand 1999). Les reboisements restent une priorité et concernent la foresterie villageoise répondant à des objectifs multiples (bois d'énergie, bois de construction, protection des sols, maintien de leur fertilité, *etc.*).

2.4.1. L'introduction d'espèces exotiques

L'intérêt majeur des introductions, mais aussi le risque, porte sur l'absence, dans le milieu, de prédateurs, parasites, ou de pathogènes qui pourraient empêcher le développement de l'espèce. Les eucalyptus sont largement utilisés dans le monde et ils montrent, en dehors d'événements localisés, une adaptation sans problèmes phytosanitaires majeurs recensés à ce jour. En revanche, les premières importations d'espèces forestières sont mal ou pas documentées et dans la plupart des cas, elles présentent une base génétique très étroite. L'objectif des premières introductions était de vérifier l'adaptation de telle ou telle espèce. Bien souvent la variabilité intra-spécifique n'était pas prise en compte. En cas de succès, ces parcelles d'essai ont été à l'origine des premières plantations utilisées par la suite comme peuplements semenciers. Au fil des générations et des croisements entre individus apparentés, l'augmentation de la consanguinité entraîne une perte de la productivité des variétés locales.

Les arbres forestiers présentent un fardeau génétique important (allèles délétères récessifs notamment) compensé par un fort taux d'hétérozygotie. En conséquence, la connaissance des effets de la consanguinité est importante pour les programmes d'amélioration génétique. Les gains génétiques obtenus de la sélection peuvent être compromis par les effets de la dépression consanguine.

2.4.2. Intérêt des eucalyptus à Madagascar

Les eucalyptus à Madagascar se sont particulièrement bien adaptés et ne rencontrent aucun problème majeur. Sur des sols forestiers profonds, leur croissance peut être particulièrement impressionnante (Bouvet et Andrianirina 1990). Ils s'adaptent sur les sols très dégradés et ne connaissent pas de problèmes phytosanitaires même si leur croissance est en dessous de leurs potentialités. La production en semences est bonne mais la régénération naturelle est faible, limitant ainsi les risques de prolifération non contrôlée. De fait, les plantations d'eucalyptus constituent une des composantes principales des programmes d'aménagement et de

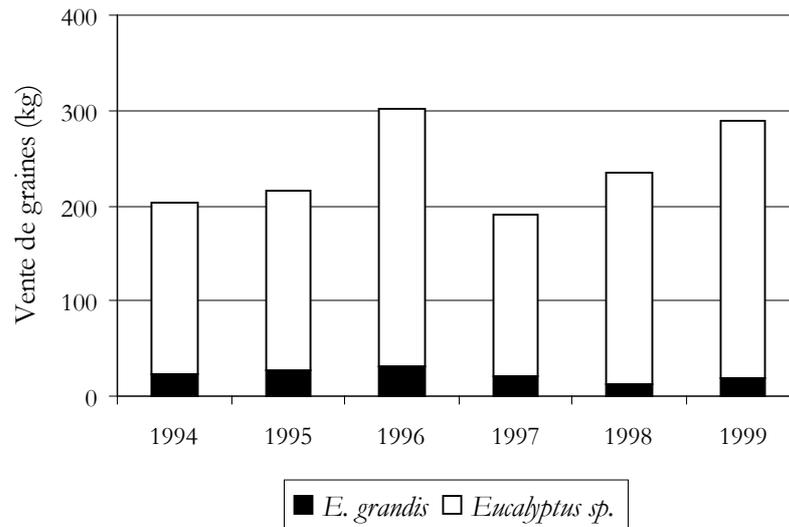


Figure 20. Vente annuelle, à Madagascar, de graines d'eucalyptus et d'*E. grandis* par le Silo National des Graines Forestières (Sngf 1999, 2000)

Tableau 5. Vente annuelle nationale (kg) du Sngf par groupe d'espèces et surfaces potentielles de reboisement pour l'année 1999 (Sngf 1999, 2000)

Espèces	1997	1998	1999	Surface (hectares)
Acacia	-	60	40	600
dont <i>A. mangium</i>		32		
Eucalyptus	170	221	269	26000
dont <i>E. robusta</i>		111	125	12000
dont <i>E. camaldulensis</i>		62	81	8000
dont <i>E. citriodora</i>		20	35	500
Teck	-	168	60	20
Autres feuillus	64	335	131	30
Pins et résineux	125	180	134	120
Espèces agroforestières	1110	1578	2423	2500
Totaux	1469	2542	3057	29270

La surface en hectare est estimée par : $S = (\text{densité} \times \text{vente 1999} \times 0,75 \times 0,5) / 2500$ plants à l'hectare à la plantation, densité en graines/kg, vente 1999 en kg, 0,75 = pouvoir germinatif moyen), 0,5 = on suppose que les pertes en plants sont de 50%.

développement à Madagascar (figure 19). Bigot *et al.* (1992) et Rakotomavo (1995) ont montré que les surfaces plantées en eucalyptus augmentent. Dans les années à venir, la croissance démographique, la diminution de la surface forestière et les diverses mesures de protection des forêts naturelles vont accroître l'intérêt pour les plantations. Les espèces les plus couramment employées sont par ordre décroissant : *E. robusta*, *E. camaldulensis* et *E. citriodora*. *E. grandis* est moins connu mais la qualité de son bois et ses potentialités de croissance sur tout le versant Est de l'île sont des atouts majeurs. Dans ce contexte, de nouvelles introductions ont été effectuées dans les années 1980.

Toutes espèces confondues (une cinquantaine), la demande annuelle en semences forestières est de plusieurs centaines de kilogrammes. Elle montre que les objectifs de plantation sont réels (Sngf 2000). Au total, le Sngf vend annuellement entre trois et quatre tonnes de graines. La part des espèces de reboisement se situe autour de 500 kg dont 250 à 350 kg pour les seuls eucalyptus (figure 20, tableau 5). La demande provient de l'ensemble des opérateurs nationaux du développement (projets, ONG, particuliers, sociétés privées, *etc.*) qui contribuent à l'effort de reboisement. En considérant les pertes en pépinière, ceci correspondrait à la mise en place effective de 30 000 hectares d'eucalyptus. La quantité de graines d'*E. grandis* vendue annuellement par le Sngf se situe entre 15 et 30 kilogrammes.

Les besoins en semences forestières sont en croissance compte tenu de l'importance du bois pour les ménages malgaches, du contexte économique du pays et de la nécessité de conserver et de maintenir le couvert forestier. Actuellement, les besoins en bois énergie sont de l'ordre de 15-20 millions de m³/an. Ils vont augmenter tout comme la demande en bois de service et bois d'œuvre qui évolue avec celle du secteur de la construction, lui-même en plein essor. Le choix du pays s'est donc orienté vers la production de semences améliorées afin de garantir une production accrue et plus homogène des plantations forestières tout en diversifiant les produits. La production de graines repose essentiellement sur les peuplements existants et nous avons vu, précédemment, ce que cela impliquait.

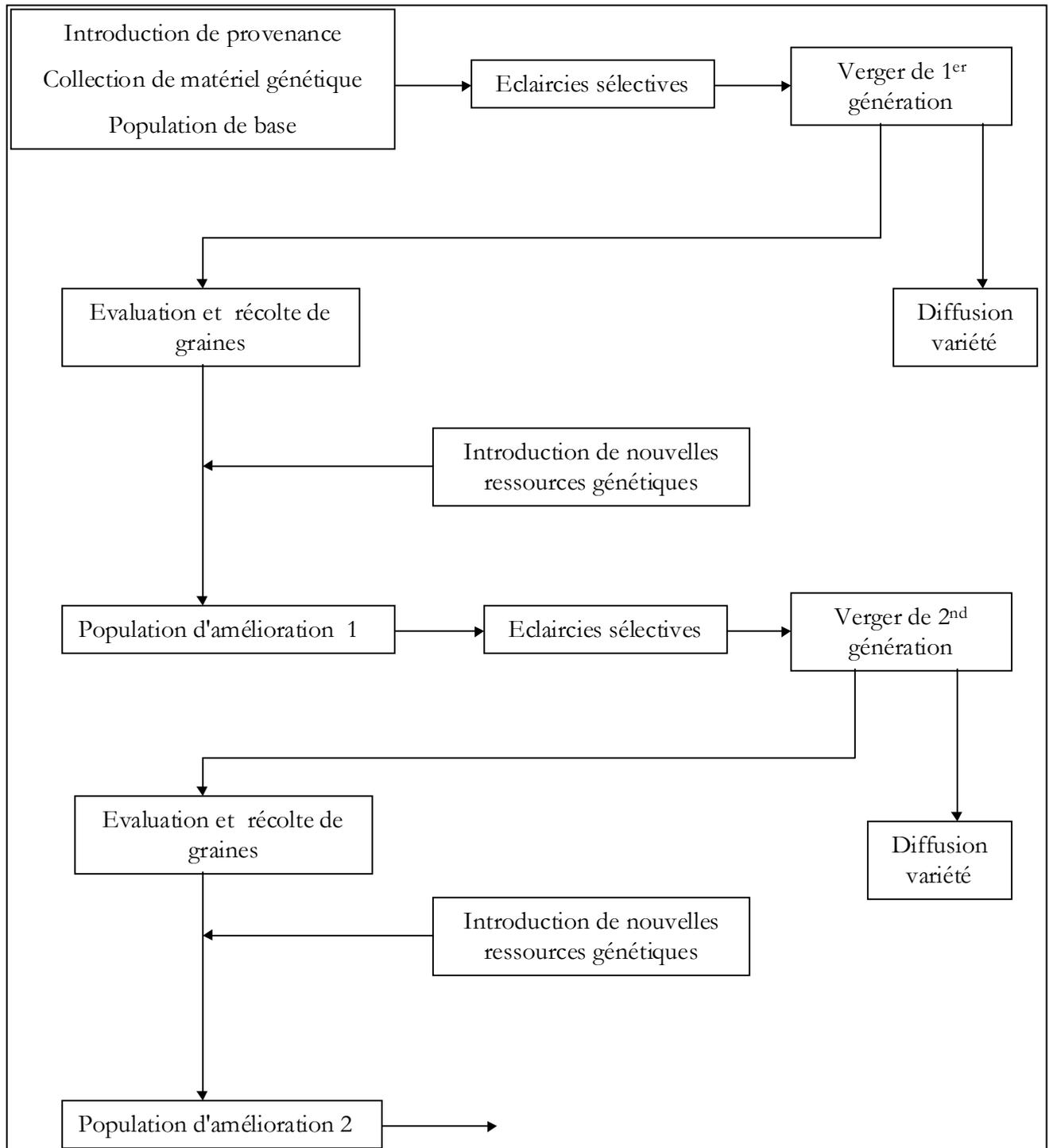


Figure 21. Schéma du programme d'amélioration génétique, à Madagascar, des espèces feuillues par sélection récurrente à l'aide de vergers à graines

2.4.3. Amélioration génétique des eucalyptus à Madagascar

L'objectif du programme d'amélioration du Fofifa et du Cirad-forêt est de répondre à la demande en semences forestières. Il concerne principalement les espèces de reboisement dont la production répond à des usages multiples. La stratégie consiste à produire des variétés plastiques, rustiques, et à croissance juvénile forte. Ces variétés sont destinées à la foresterie villageoise et doivent être distribuées sous forme de graines. Le choix s'est donc porté sur la production, dans la région d'utilisation, de variétés synthétiques produites en pollinisation libre.

Il s'agit de conduire un schéma de sélection récurrente pour une vingtaine d'espèces feuillues et cinq espèces de pins tropicaux, au moyen de vergers à graines, dans les quatre zones bioclimatiques du pays (figure 21). Ces vergers constituent, à chaque cycle de sélection, les populations d'amélioration. Ils sont utilisés à plusieurs fins et on y combine à la fois la conservation des ressources génétiques, leur sélection, le recueil d'information et la production de graines.

L'introduction d'une importante variabilité génétique est fondamentale. En effet, le dispositif expérimental est élaboré de manière à évaluer, dans un premier temps, la variabilité intraspécifique de l'espèce. La transformation de la parcelle en verger à graines s'effectue par des éclaircies successives conduisant à ne conserver, dans chaque provenance ou chaque famille, que les meilleurs individus. Les premières éclaircies sont essentiellement sanitaires et interviennent avant l'âge de 2 ans. Il s'agit d'éliminer les arbres malingres, malades, buissonnants (nains), mal conformés, *etc.* Les éclaircies suivantes sont basées sur des index de sélection prenant en compte la croissance en diamètre, en hauteur et les caractères qualitatifs tels que la rectitude du tronc, la hauteur de fourche, la présence de grosses branches et leur niveau d'insertion. Les dispositifs de ces vergers doivent permettre de se rapprocher d'un régime de reproduction panmictique et visent à réduire les effets des croisements consanguins en favorisant les croisements inter-provenances ou inter-familles.

Les populations d'amélioration de seconde génération sont issues des récoltes effectuées sur des « arbres plus »¹ se reproduisant en pollinisation libre. Ils sont sélectionnés sur des critères de croissance et de forme. En conséquence, elles sont constituées par des familles de demi-frères,

¹ Arbre au phénotype remarquable

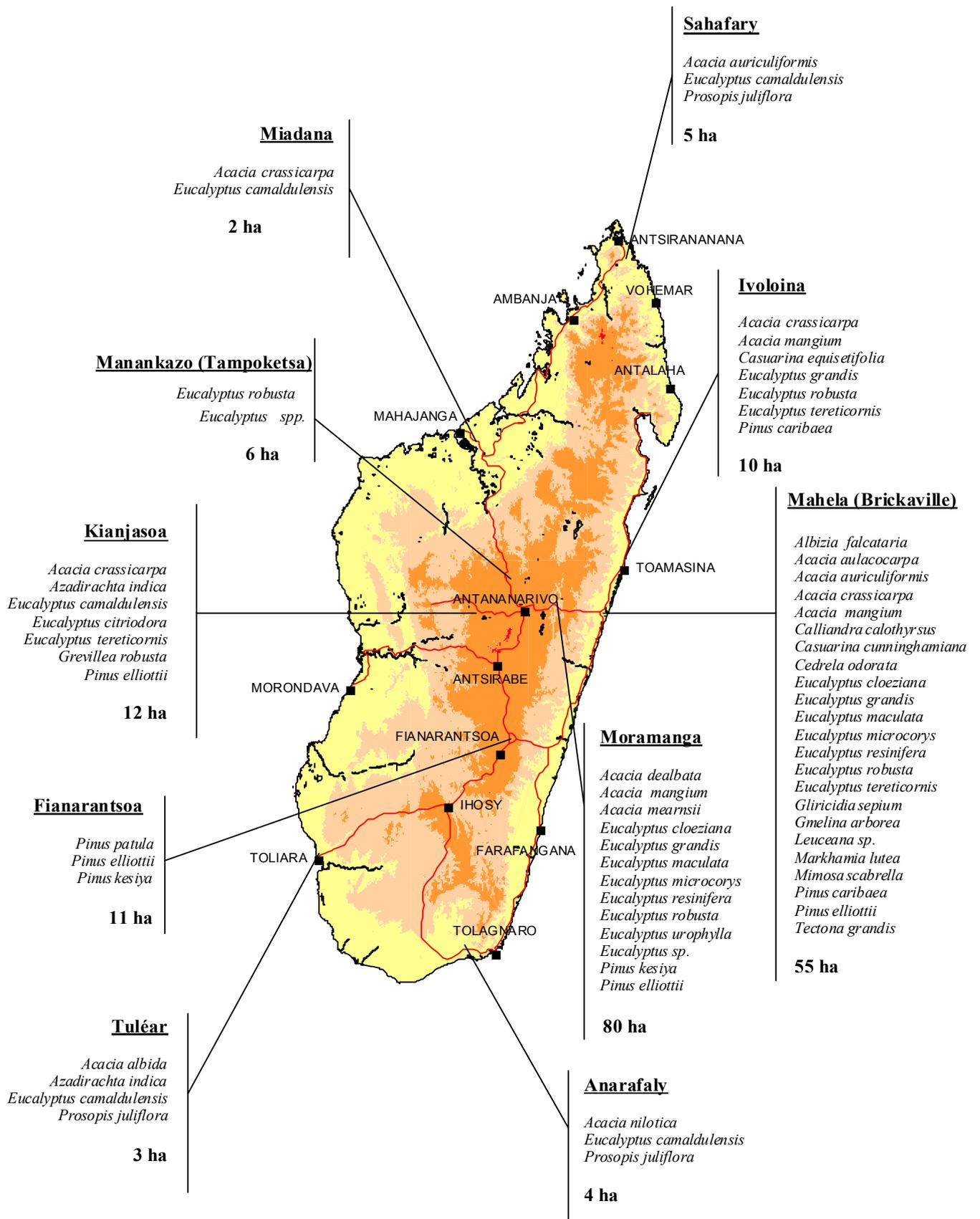


Figure 22. Implantations et surfaces correspondantes par station du dispositif de production de semences forestières du FOFIFA/DRFP/Cirad-Forêt

d'une proportion non négligeable de plein-frères et sans doute d'individus issus d'autofécondation. Au fil des cycles de sélection, le niveau de consanguinité des populations augmente. Pour limiter cette évolution, le sélectionneur intervient à deux niveaux en :

- constituant généralement des populations de base diversifiées ;
- augmentant la variabilité génétique des populations par leur recombinaison.

Le dispositif de production de semences, dont les premières réalisations ont une quinzaine d'années, se compose de 180 hectares de parcelles toutes espèces confondues (eucalyptus, pins, acacias, autres feuillus). En ce qui concerne les eucalyptus, la totalité des parcelles semencières couvre maintenant 60 hectares pour 10 espèces (figure 22). Pour une telle surface, l'estimation de la production grainière annuelle se situe entre 150 et 250 kilogrammes. Les vergers d'*E. grandis* couvrent une surface de 7,9 hectares (tableau 6, page suivante) et assurent une production annuelle comprise entre 15 et 25 kg (Chaix et Ramamonjisoa 2001).

2.5. CONTROLE DE LA QUALITE DES DESCENDANCES

Le sélectionneur a les moyens d'agir à différentes étapes du schéma d'amélioration par les méthodes que nous évoquerons ci-après. De façon classique, la valeur des géniteurs en croisement et celle de la variété s'estiment à partir des résultats recueillis dans les essais de descendances sans connaître les événements de pollinisation. L'objectif de notre étude est de contrôler, au mieux, les sources de déviation à la panmixie. Il s'agit du choix des provenances introduites, de la croissance des arbres, de leur phénologie, d'éliminer certains individus susceptibles d'être consanguins, d'augmenter le brassage génétique, de recourir aux croisements contrôlés, de vérifier la variabilité de la capacité germinative des graines produites ou encore de l'étude des flux de pollen qui sera développé plus amplement.

2.5.1. Les approches classiquement utilisées

Différentes options permettent de contrôler la variabilité génétique des vergers à graines. La création d'une population de base repose sur le choix des origines basé sur les connaissances acquises de l'espèce. La diversité génétique est proportionnelle au nombre de provenances et de semenciers les constituant. Il s'agit également de constituer les populations d'amélioration à partir de génotypes originaires de plusieurs vergers à graines existants pour l'espèce considérée, en

Tableau 6. Dispositif de production en semences d'*E. grandis* à Madagascar

Lieu	Superficie (hectare)	Type de verger	Nombre de provenances ou de descendances
Antsirinala	1,6	2 vergers de familles	20 descendances sélectionnées
Mahela	5,3	1 verger de semis 1 verger de familles	9 provenances australiennes 16 descendances sélectionnées
Ivoloina	1,0	1 verger de familles	13 descendances sélectionnées
Surface totale	7,9		

bénéficiant, par-là, de l'effet d'hétérosis tout en limitant la consanguinité. La réintroduction de ressources génétiques de l'aire naturelle permet de gagner en variabilité, mais on perd une partie des gains génétiques acquis. Enfin, nous pouvons envisager le mélange de plusieurs familles de demi-frères d'un même verger correspondant à plusieurs années de production. Mais l'évolution du nuage pollinique d'une année sur l'autre est inconnue.

La variabilité des caractères de croissance dépend, en partie, des effets génétiques des différents génotypes. Chez les eucalyptus, elle est d'autant plus grande que l'aire naturelle de l'espèce considérée est importante, ceci conduisant à la constitution de plusieurs catégories d'arbres en fonction de leur taille et de leur développement. La prise en compte de la variabilité phénologique des différentes provenances de l'espèce permettrait, si elle existe et si elle est stable, de revoir le dispositif des vergers à graines. En définitive, il s'agirait d'effectuer la randomisation des génotypes dans la parcelle sous la double contrainte du comportement phénologique et de l'apparentement possible des individus.

Au niveau de la pollinisation, la proposition, la plus simple et habituellement proposée, consiste à introduire des colonies d'abeilles domestiques dans les zones de production. Moncur *et al.* (1995) ont montré, sur plusieurs espèces, que l'apport de ruches dans les vergers à graines augmentait significativement le taux d'allogamie et de remplissage des capsules. De plus, les échanges de pollen au sein des ruches favorisent le brassage génétique au sein d'un verger (Free et Williams 1972).

On peut facilement équilibrer la part maternelle des géniteurs d'un verger en pollinisation libre, avec des tests de germination effectués au préalable et en rééquilibrant, au besoin, les contributions par des mélanges adéquats de graines. La maîtrise de la pollinisation contrôlée permet de créer des populations d'amélioration de seconde génération en équilibrant les parts mâles et femelles des géniteurs sélectionnés. Leurs aptitudes à la combinaison sont estimées à partir des données recueillies sur les descendance de plein-frères. Récemment, les techniques en pollinisation contrôlée ont été mises au point pour améliorer la rentabilité et la fiabilité de la production (Harbard *et al.* 1999, Williams *et al.* 1999). Toutefois, elles ne sont pas envisageables pour la production en masse de graines que nécessitent les reboisements villageois.

La recherche en paternité basée sur les différents types de marqueurs permet d'effectuer un choix des descendants, selon leur paternité, avant la plantation. Ceci conduit à la constitution de

populations artificielles où la représentativité des géniteurs est équilibrée et les individus issus de croisements consanguins éliminés. Chez le trèfle, par exemple, l'approche flux de gènes est relativement simple et ne requiert pas un niveau important de technicité à partir du moment où il existe des marqueurs morphologiques, pour certains génotypes, permettant d'identifier le père ou les pères concernés (Cowan 2000). Sans ces caractères anatomiques à déterminisme génétique simple, l'approche nécessite la prise en compte d'un grand nombre de marqueurs morphologiques dont l'expression peut être fortement modulée par l'environnement. Néanmoins, le contrôle du milieu permet de diminuer cette part environnementale. Pour les espèces forestières, il est plus difficile à mettre en œuvre car les durées de croissance sont longues et les caractères, habituellement utilisés, sont à déterminisme polygénique. Toutefois, dans le cas de marqueurs morphologiques précoces au stade plantule, cette approche reste possible. Hodgson (1976b) a estimé, par exemple, des taux d'autofécondation chez *E. grandis* à partir de la fréquence des plantules anormales après germination. En conclusion, chez les espèces forestières, l'étude des flux de gènes, basée sur des marqueurs génétiques, constitue la méthode la plus efficace.

2.5.2. Principe d'étude des flux de gènes

Qu'il s'agisse d'échanges à l'intérieur d'une population ou entre plusieurs populations, un flux de gènes résulte de deux types de dispersion, celui du pollen et celui des graines. Les différents moyens de dispersion pour l'un ou l'autre type sont le vent, la gravité, les animaux et l'eau.

L'estimation des flux de gènes s'effectue soit à partir :

- de la mesure de la différenciation génétique entre deux populations correspondant à une caractérisation de la distribution de la variabilité génétique. Il existe plusieurs façons indirectes de définir la relation entre deux gènes (donc la variabilité génétique), qu'il s'agisse de la théorie de la consanguinité (les relations génétiques entre populations sont reconstituées par le jeu des identités ou par le biais des F-statistiques) ou de la théorie de la coalescence (basée sur l'estimation du temps qui sépare deux ou plusieurs gènes de leur ancêtre commun). Ces méthodes ne sont pas développées ici ;
- de mesures directes du flux de gènes réel, méthode que nous avons retenue afin de caractériser les événements de pollinisation réussis dans un verger à graines.

2.5.2.1. Les différentes méthodes d'étude des flux de gènes

Levin et Kester (1974) ont défini deux notions : le flux de gènes potentiel comme le dépôt de pollen (ou de graines) à partir d'une plante source selon la distance et le flux de gènes efficace correspondant au succès de la pollinisation jusqu'à l'obtention d'individus viables toujours selon la distance de l'individu source. L'écart entre les flux de gènes potentiels et efficaces traduit l'action de la sélection au niveau pré-zygotique (incompatibilité ovule/pollen, compétition pollinique) et post-zygotique (avortement des embryons ou faible viabilité des graines).

Les études du flux de gènes potentiel font appel aux mesures physiques de la dispersion des pollens et des graines. Elles sont abordées directement en suivant les mouvements de pollen via des marqueurs fluorescents ou radioactifs (Thomson *et al.* 1986). Pour le flux de gènes efficace, il est nécessaire de disposer d'outils de marquage qu'ils soient morphologiques, enzymatiques ou moléculaires. Dans notre étude, nous nous intéresserons au flux de gènes efficace correspondant aux mouvements de pollen.

Les modèles physiques de dispersion du pollen ont été développés sur les espèces anémophiles. Ils sont basés sur trois paramètres : la gravité, la vitesse du vent et les turbulences atmosphériques qui dépendent du type de peuplement. Ces modèles ont été élaborés au sein de verger à graines de manière à définir les règles d'installation et de gestion. Les modèles de diffusion des gaz ou des fumées ont été appliqués à la diffusion de pollen. Ils sont basés sur les résultats du piégeage de pollen au moyen de supports collants situés à des distances régulières d'un individu source isolé. Cette approche montre que la majorité du pollen se trouve dispersée à des distances proches de la source. Au-delà d'un certain seuil, la dispersion se stabilise suggérant des migrations possibles sur de longues distances bien que celles-ci soient difficiles à échantillonner et ne sont pas forcément mesurées. Les études, basées sur une population isolée, mesurent le cumul des dispersions de tous les individus de la population. Elles montrent cependant plusieurs limites : la dispersion à partir d'un arbre donné est différente selon les caractéristiques du peuplement dans lequel il se trouve. Paradoxalement, l'ensemble de ces méthodes montre que la dispersion de pollen se fait sur de plus longues distances par jour sans vent. La direction des vents entraîne une anisotropie des dépôts de pollen autour d'un arbre source et la topographie joue un rôle non négligeable dans la dispersion du pollen (Streiff 1998, tirée de la synthèse de Couvet *et al.* 1999).

Tableau 7. Comparaison des caractéristiques générales des différents types de marqueurs et de leur pertinence pour l'analyse de paternité (tiré de Plomion *et al.* 1996)

	Morphologiques	Isozymes	RAPD	RFLP	AFLP	Microsatellites
Caractéristiques génétiques						
Déterminisme génétique	Dominant	Codominant	Dominant	Codominant	Dominant	Codominant
Nombre d'allèles	Données quantitatives	Généralement 2	2	Multiallélique	Multiallélique	Multiallélique
Base moléculaire du polymorphisme	Caractères exprimés	Protéines exprimées	Fragments amplifiés au hasard	Fragments de restriction		Nombre variable de répétitions d'une séquence nucléotidique
Nombre de loci disponibles	Limité	< 50	Illimité	Illimité	Illimité	Illimité
Transfert de marqueurs	Non	Présence générale	intra-famille et intra-espèce	Inter-espèce et intra-genre		Intra-espèce et inter-espèce
Caractéristiques techniques						
Etapes de détection	Mesures	Extraction des enzymes Electrophorèse en gel d'amidon Détection enzyme-spécifique	Extraction d'ADN génomique Amplification PCR Electrophorèse sur agarose Coloration au bromure d'éthidium	Extraction d'ADN génomique Digestion enzymatique Electrophorèse sur agarose	Extraction d'ADN génomique Digestion enzymatique Préamplification PCR Amplification sélective PCR Gel d'acrylamide Coloration au nitrate d'argent Ou autoradiographie	Extraction d'ADN génomique Sélection de clones Séquençage d'ADN Synthèse d'oligonucléotides Amplification PCR Electrophorèse gel acrylamide Coloration au nitrate d'argent Ou autoradiographie
Difficultés pour le transfert	Aucun transfert	Optimisation des tampons d'extraction	Criblage d'oligonucléotide disponible sur le marché	Construction d'une banque spécifique Criblage des sondes monocopies		Construction d'une banque spécifique Criblage des oligonucléotides
Critères d'utilisation en analyse de paternité						
Pertinence / inconvénient	Influence environnement	Faible polymorphisme		Haut polymorphisme		Haut polymorphisme
Efficacité d'acquisition des données	Haute	Haute	Elevé	Moyen	Elevé (séquenceur)	Haute (séquenceur)
Coût par données incluant le temps de travail	Moyen à élevé	Faible	Faible	Moyen à élevé	Faible	Moyen à élevé
Accessibilité de la technique dans un programme d'amélioration	Très bonne	Très bonne	Très bonne	Moyenne	Faible	Faible

Les analyses de flux efficace sont basées sur la comparaison des génotypes des descendants avec ceux de la population parentale. Plusieurs modèles ont été développés, qu'il s'agisse :

- du « Mixed mating model » (Brown *et al.* 1985) qui concerne le flux entre un arbre et la population ;
- des flux discrets de gènes entre deux compartiments basés sur le premier modèle en considérant, en plus, le pollen venant de l'extérieur (Adams et Birkes 1991) ;
- des flux continus de gènes reposant sur la construction de courbes de distribution du pollen en fonction de la distance par rapport à l'arbre puits ou à l'arbre source. Ces courbes sont établies soit par la méthode de l'allèle rare soit par la recherche de paternité.

La méthode de l'allèle rare consiste à évaluer la proportion relative de descendants issus d'un individu « source » porteur d'un allèle rare dans des lots de graines récoltés sur des arbres situés à des distances de plus en plus importantes. Il s'agit d'observer la diffusion du pollen à partir d'un individu donné. Elle nécessite de trouver un arbre porteur d'une mutation unique dans un peuplement. Cette approche ne concerne qu'un arbre et ne permet pas d'évaluer les variabilités individuelles. La seconde méthode, qui nous intéresse plus particulièrement, concerne la recherche de paternité et s'apparente à une approche de type « puits ». Il s'agit alors d'observer les flux en direction d'un individu donné. Dans les conditions où le degré de parenté des géniteurs est connu, elle offre l'avantage de reconstituer les différents types de croisements.

2.5.2.2. Approches relatives aux recherches de paternité

La méthode basée sur la recherche de paternité consiste à génotyper tous les arbres d'un peuplement ou d'une parcelle et de récolter des graines sur un certain nombre d'individus « puits ». A partir des génotypes des pères potentiels, de la mère et des descendants dont on soustrait la part maternelle, on recherche le père parmi les candidats potentiels. Chaque fois qu'il y a, à un locus donné, incompatibilité entre l'haplotype paternel et le génotype d'un père potentiel, ce père est exclu. Cette procédure est répétée à chaque locus et elle aboutit généralement à trois réponses possibles : i) tous les parents potentiels constituant le peuplement ont été exclus, on fait l'hypothèse que le pollen provient de l'extérieur de la parcelle ; ii) un seul parent n'a pas été exclu, on pourra conclure à sa paternité mais il peut aussi s'agir d'un père extérieur à la parcelle ayant le même génotype, on parle de flux de gène caché ; iii) plusieurs arbres n'ont pas été exclus, on s'appuie alors sur un calcul de vraisemblance qui va donner un

score à chaque candidat et qui permettra de désigner le père le plus probable. Ces méthodes probabilistes sont basées sur le théorème des probabilités de Bayes (Couvét *et al.* 1999, Streiff 1998).

La puissance des analyses de parenté est mesurée par la probabilité dite d'exclusion. Elle mesure la proportion de parents exclus sur la base de l'exclusion génétique. Plus la probabilité est proche de 1, plus l'analyse est puissante. Elle est directement liée au polymorphisme du marqueur étudié et augmente avec le nombre de loci pris en compte, le nombre d'allèle par locus et l'équilibre des fréquences alléliques (Adams 1992). La méthode est décrite précisément dans la deuxième partie du document.

2.5.2.3. Les marqueurs utilisables pour les analyses de paternité

La puissance de l'analyse de paternité repose sur le type de marqueur génétique utilisé. Nous présentons, ici, une revue de leur utilisation et donnons un éclairage particulier sur ceux qui sont, actuellement, plus spécifiquement utilisés pour les analyses de paternité.

Nous avons vu précédemment la difficulté d'employer les marqueurs morphologiques. La limitation des marqueurs biochimiques (protéines, enzymes) réside sur le faible nombre de loci susceptibles d'être révélés ainsi qu'une certaine spécificité d'organe et/ou du stade de développement. A priori, on peut utiliser tous les types de marqueurs moléculaires pour étudier les systèmes de reproduction et effectuer les analyses de paternité. Leur mise en œuvre ou les moyens à y consacrer seront effectivement différents. Les sources de marqueurs moléculaires reposent soit sur du polymorphisme de séquence soit sur du polymorphisme d'unités de répétitions. Les caractéristiques générales des principaux types de marqueurs sont résumées dans le tableau 7. Le séquençage est la seule méthode exhaustive de recherche de polymorphisme dans un fragment d'ADN. Malgré les progrès de l'automatisation, l'utilisation de cette méthode en routine n'est pas développée dans cette optique pour des raisons de coûts liés aux grands effectifs utilisés en génétique des populations. On a donc recours à des méthodes indirectes, non exhaustives, mais plus rapides et moins coûteuses qui ne concernent qu'une fraction du génome (Plomion 1999). Dans ce groupe, nous avons les marqueurs dominants (RAPD - Random Amplified Polymorphism DNA, AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism) et les marqueurs codominants (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism, SSCP Single Strand Conformation Polymorphism). Les marqueurs qui reposent sur du polymorphisme de

nombre de répétitions sont les microsatellites (SSR : Simple Sequence Repeats) et les minisatellites.

Les marqueurs dominants sont susceptibles d'être moins efficaces liés au type d'information recueillie : absence, présence de l'allèle sans distinction de l'hétérozygote et de l'homozygote (Nesbitt *et al.* 1997). Néanmoins, Krauss et Peakall (1998) comme Gerber *et al.* (2000) ont montré les possibilités d'application des marqueurs AFLP pour l'analyse de paternité à condition d'en utiliser un nombre relativement important et de les choisir en fonction de leur distribution allélique. Les marqueurs co-dominants (isozymes, RFLP, microsatellites) apportent plus d'informations en distinguant les homozygotes des hétérozygotes. A la différence des autres marqueurs codominants, les RFLP n'ont jamais été appliqués aux études de paternité et analyses de flux de gènes car ils nécessitent des techniques de laboratoire longues et onéreuses.

Les premiers employés, les isozymes, ont été les plus utilisés chez les arbres forestiers. Ils sont à l'origine de nombreuses recherches et particulièrement sur les systèmes de reproduction, le contrôle des niveaux de contamination dans les vergers à graines, la vérification de l'apport de pollen dans les vergers à graines, l'estimation des flux de gènes, et les aspects de compétition pollinique (Rudin et Lindgren 1977, Wheeler et Jech 1992). Malgré de nombreux inconvénients, ces marqueurs, longtemps les seuls disponibles, ont été abondamment utilisés. En effet, ils ne permettent l'analyse du polymorphisme que sur un nombre limité de locus, rarement plus d'une trentaine chez les plantes (Tanksley et Orton 1983). Par ailleurs, même si les loci enzymatiques présentent parfois de nombreux allèles, ils ont des profils de fréquence très déséquilibrés avec quelques allèles fréquents et de nombreux allèles rares. Ceci nécessite de travailler avec un nombre important de marqueurs pour distinguer les individus. Par ailleurs, l'extraction des enzymes est plus délicate chez les plantes pérennes en raison de nombreux métabolites secondaires. Le nombre de types de réactions colorées disponibles pour les révéler est limité. De plus, il est nécessaire de travailler sur du matériel végétal frais, car sa dégradation entraîne des perturbations des systèmes enzymatiques. Chez les espèces forestières, les dispositifs de terrain sont généralement éloignés des laboratoires, ce qui conduit à des difficultés supplémentaires liées au stockage et à l'acheminement des extraits végétaux.

Les microsatellites sont constitués de répétition en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétra-nucléotidiques, le nombre de répétitions pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Cependant, leurs tailles sont limitées et atteignent un seuil limite au-delà duquel ils seraient

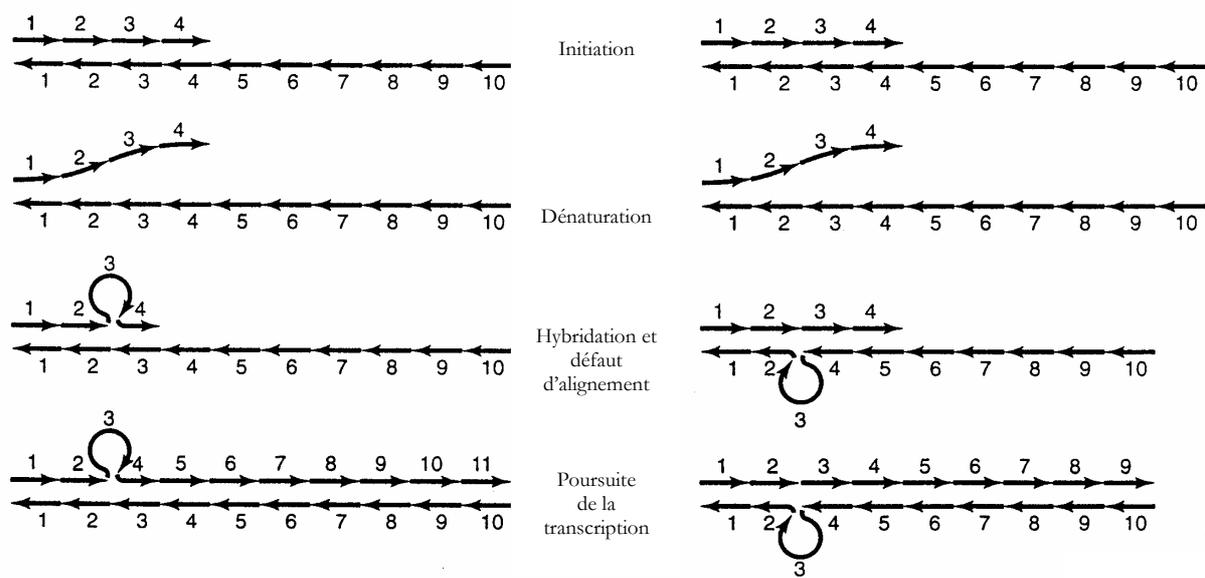


Figure 23. Mécanismes d'évolution des microsatellites (Ellegren 2000)

instables (Ellegren 2000). Le nombre de répétitions du motif nucléotidique dépend également de la composition de celui-ci et en particulier de sa richesse en G et C. Ces marqueurs neutres, non codant, ne subissent pas, *a priori*, les effets de la sélection. Ceci n'exclut pas qu'ils aient une fonction même s'ils ne sont ni transcrit, ni traduits.

Les mécanismes d'évolution des microsatellites demeure un sujet de discussion (Ellegren 2000). Le principal mécanisme d'évolution est l'ajout ou la suppression d'un motif (figure 23). Dans ce cas, une mutation conduit à la formation d'un variant pouvant déjà exister dans la population. De fait, deux allèles de taille identique peuvent être issus d'une évolution identique ou différente, on parle d'homoplasie. Différents modèles de mutation sont proposés, il s'agit : i) de la formation d'une simple boucle du brin matrice de l'ADN dénaturé du fait des séquences répétées ; ii) de crossing-over inégaux ; iii) de conversion de gènes ; iv) de la perte ou du gain de 2 à 5 motifs. Chez les eucaryotes, le taux de mutation dans une séquence d'ADN est de l'ordre de 10^{-9} par génération (Ellegren 2000). Le taux de mutation des microsatellites est plus élevé. Il dépend de l'espèce, du locus et de sa localisation dans le génome. Il est corrélé positivement avec le nombre de paires de bases. Les probabilités de mutation ne semblent pas identiques qu'il s'agisse de l'ajout ou de la suppression d'un motif. Chez l'homme ce taux va de 6.10^{-4} à 1.10^{-3} par méiose. Il est de 6.10^{-6} chez la *Drosophila* et de 10^{-2} pour *Egernia stokesii*, un lézard australien (Ellegren 1997).

Les marqueurs microsatellites sont développés depuis une quinzaine d'années pour le règne animal. Ils ont été rapidement utilisés pour les espèces agricoles de première importance comme le riz (Wu et Tanksley 1993), le soja (Morgante *et al.* 1994), le maïs (Senior et Heun 1993), le blé (Becker et Heun 1995). Les cartes les plus saturées en microsatellites montrent qu'il n'existe pas de distribution particulière de ces loci.

Les premiers développements de ces marqueurs sur les espèces forestières datent d'une dizaine d'années et ils sont utilisés en routine depuis 6-7 ans. L'adoption de la technique a débuté sur les résineux (Condit et Huebhel 1991) puis les chênes (Streiff 1998, Dow et Ashley 1996), et les eucalyptus en 1996 (Byrne *et al.* 1996, Brondani *et al.* 1998, Chaix *et al.* 2002). Ils ont ainsi prouvé leur intérêt dans le cadre des études liées aux espèces forestières : cartographie génétique, diversité génétique, études de parenté (Boshier *et al.* 1995, Dow et Ashley 1996, Dawson *et al.* 1997, Chase *et al.* 1996, Streiff *et al.* 1998).

Les avantages des marqueurs microsatellites sont multiples. Ils sont hyper-variables, nombreux et

régulièrement distribués dans le génome. Ils sont transférables, plus ou moins facilement, d'une espèce à l'autre, voire d'un genre à l'autre (Moore *et al.* 1991, Dayanandan *et al.* 1997, Byrne *et al.* 1996, Streiff *et al.* 1998, Rosseto 2000). Si la mise en œuvre des marqueurs microsatellites était encore lourde il y a une dizaine d'années, la simplification des protocoles (automatisation, révélation, *etc.*) et la généralisation de leur utilisation ont contribué à une diminution des coûts.

2.5.3. Résultats principaux des études de flux de gènes sur les espèces forestières

Les études de flux de gènes concernaient principalement les espèces modèles non ligneuses dans le but d'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques de la reproduction et de l'évolution de la diversité génétique des populations. Actuellement, cette approche est développée pour l'évaluation des risques de pollution pollinique des plantes génétiquement modifiées vers les espèces sauvages ou les variétés apparentées (Desplanque *et al.* 1999, Wei *et al.* 1999, Guadagnuolo *et al.* 2001). Cette approche n'a pas encore été appliquée chez les espèces ligneuses. Pourtant, la création d'arbres génétiquement modifiés, en dehors des espèces fruitières, concerne une vingtaine d'espèces pour moitié de gymnospermes (*Larix*, *Picea*, *Pinus*) et d'angiospermes (*Populus* essentiellement, *Eucalyptus*). Il s'agit principalement de la modification de la quantité de lignine ou de cellulose dans le bois, de la tolérance aux herbicides ou de la résistance aux insectes (Llewellyn *et al.* 1999, Bérenger 2000, Harcourt *et al.* 2000, Jouanin *et al.* 2000, Galiana 2001).

Les études sur l'analyse de paternité concernent autant les espèces tropicales que les espèces tempérées. Pour les premières, les études sont essentiellement menées dans l'objectif de déterminer les impacts de l'exploitation des forêts et de leur fragmentation sur le mode de reproduction des espèces et l'évolution de la diversité génétique des populations (Chase *et al.* 1996, Dawson *et al.* 1997, Dick 2001, Dutech *et al.* 2002, White *et al.* 2002). En ce qui concerne les espèces forestières tempérées, les objectifs sont différents. Il s'agit essentiellement d'estimer les flux de gènes dans les peuplements naturels dans l'objectif de mieux comprendre l'évolution des populations. Les travaux plus spécifiques aux vergers à graines concernent essentiellement les essences résineuses (voir référence dans le tableau 40 page 110).

La plupart des travaux, consacrés aux espèces allogames, montre que les flux de pollen sont intenses et que le succès reproducteur entre deux géniteurs d'une même population est indépendant de la distance qui les sépare au moins jusqu'à 150 mètres (Dow et Ashley, 1998

Streiff 1998, Buiteveld 2001). En conséquence, le génotype des descendants est le résultat d'un tirage aléatoire des différents allèles existant dans la population parentale. Néanmoins, d'autres auteurs ont montré que les flux de gènes étaient limités sous l'effet du mode de pollinisation (Govindaraju 1989, Dutech *et al.* 2002). Les taux de contamination déduits de ces travaux sont très variables et dans la grande majorité des cas, ils atteignent des valeurs élevées (Dow et Ashley 1998, Streiff 1998, Buiteveld *et al.* 2001). Ces études montrent également que les distances de pollinisation ont lieu sur de grandes distances à la différence de celles évaluées par les mesures physiques de pollen (Dow et Ashley 1998, Streiff 1998, Konuma *et al.* 2000, Lourmas 2001, White *et al.* 2002).

DEUXIEME CHAPITRE
MATERIELS ET METHODES

Tableau 8. Description des provenances du verger d'*E. grandis*

Provenance	Famille	Pays	Latitude S	Longitude N	Altitude (m)
Andranokobaka	1, 2, 3	Madagascar	18°56'	48°14'	900
Atherton	4, 5	Australie Qld	17°15'	145°42'	800
Tinaroo	6, 7, 8	Australie Qld	17°11'	145°36'	900
Ravenshoe	9, 10	Australie Qld	17°42'	145°28'	940
Paluma	11	Australie Qld	19°00'	146°00'	900
Eungella	12	Australie Qld	21°13'	148°30'	710



Figure 24. Localisation des peuplements d'origine des provenances australiennes d'*E. grandis* concernées par l'étude

DEUXIÈME CHAPITRE - MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le schéma présenté en annexe 1 illustre les différentes étapes depuis la récolte des lots d'*E. grandis* en peuplements naturels jusqu'à l'intégration des résultats de notre étude. Celle-ci s'intéresse à trois étapes de ce schéma : évaluation de la variabilité intra-spécifique d'une espèce dans son milieu d'introduction, étude de la reproduction du verger après estimation des flux de gènes et conséquences sur la qualité de la variété produite.

1. MATÉRIEL VÉGÉTAL

1.1. VERGER A GRAINES

Les tests effectués dans les années 1980 ont montré la remarquable adaptation, à la région Est de Madagascar, des provenances du Nord de l'aire naturelle d'*E. grandis*. Il a été décidé de poursuivre l'amélioration par la mise en place d'un essai de descendance, transformé, à terme, en verger à graines.

L'essai a été planté sur la station d'Antsirinala (latitude : 18°07S, longitude : 48°13W). Le site est à 900 mètres d'altitude, la température annuelle moyenne est de 19°C et la pluviométrie atteint 1500 mm par an. Le terrain est caractérisé par des terrasses lacustres. Il était occupé par une plantation de *Pinus caribaea* qui a été abattue et débardée. Le sol a été labouré au « cover crop ». Durant les travaux en pépinière, deux sélections intra-familles ont été appliquées en retenant les plus grandes plantules dans les planches de semis avant le repiquage puis les plants les plus vigoureux en fin d'élevage. La plantation a eu lieu en février 1987. L'écartement initial était de 3 x 3 mètres en carré (annexe 2). Une fertilisation de 200 g NPKZn (8-16-24-2) et de 50 grammes d'urée par trou de plantation a été apportée une semaine avant la mise en terre des jeunes plants (Bouvet et Rakotonjanahary 1988).

Les douze familles du verger correspondent à des familles de demi-frères issues de pollinisation libre. Les peuplements d'origine sont situés à Madagascar et en Australie (tableau 8, figure 24). Les trois familles de la provenance malgache ont été récoltées sur des arbres dans l'essai de provenances d'Andranokobaka planté en 1974 et situé sur la même station. Ces familles sont susceptibles d'être le résultat de croisements inter provenances et de présenter une variabilité intra famille plus élevée. Les arbres sélectionnés étaient issus de la provenance Atherton (familles

Tableau 9. Composition initiale et actuelle du verger à graines d'*E. grandis*

Provenance / famille	Effectif initial	%	Effectif actuel	%	Taux de sélection
Andranokobaka	120	18,2	83	23,8	30,8
1	40	6,1	31	8,8	22,5
2	40	6,1	30	8,6	25,0
3	40	6,1	22	6,3	45,0
Atherton	120	18,2	45	12,9	62,5
4	40	6,1	36	0,3	10,0
5	40	6,1	9	2,6	77,5
Tinaroo	120	18,2	46	13,2	61,7
6	40	6,1	16	4,6	60,0
7	40	6,1	13	3,7	67,5
8	40	6,1	17	4,9	57,5
Ravenshoe	80	12,2	59	16,8	26,2
9	40	6,1	25	7,2	37,5
10	40	6,1	34	9,7	15,0
Paluma	40	6,1	9	2,6	77,5
11	40	6,1	9	2,6	77,5
Eungella	40	6,1	0	0,0	100,0
12	40	6,1	0	0,0	100,0
Bordure	178	27,1	107	30,7	39,9
Totaux	658	100,0	349	100,0	47,0



Figure 25. Vue du verger à graines d'*E. grandis* à Antsiranalala

n°1 et n°3, numéro national 86027 et 8605) et Ampamaherana (famille n°2, numéro national 72173). Cette dernière constitue sans doute une deuxième génération malgache. Le reste des familles provient des lots récoltés en Australie sur des individus, *a priori*, non sélectionnés. Ils proviennent du Nord de l'aire naturelle (dont Atherton), où les conditions climatiques (climat de type chaud et humide à pluies estivales) sont proches de celles de la zone d'étude. Les provenances de cette région de l'Australie, en particulier d'Atherton, sont les plus adaptés et les plus productives.

Les répétitions, ou blocs, au nombre de 40, sont représentées par 12 unités expérimentales constituées d'un seul arbre (parcelle mono-arbre) provenant d'une des 12 familles. L'essai est entouré de deux lignes de bordure constituées par des « fonds de pépinière », non identifiés. A l'intérieur de chaque bloc, l'emplacement des individus est attribué au hasard. Chaque individu « mère » se trouve ainsi entouré par un lot de « pères » dont la répartition est aléatoire. Cette disposition cherche à favoriser le brassage génétique dans le verger. L'essai était donc constitué de 672 individus, dont 480 arbres pour le plateau central et 192 arbres pour la bordure. En 1992, une éclaircie sélective a été réalisée à 5 ans.

Au démarrage de notre étude, il ne restait plus que 349 arbres au total dont 242 pour le plateau central et 107 pour la bordure. Une famille a été complètement éliminée après la première éclaircie du fait de sa très faible croissance. Les 11 familles restantes ne sont plus représentées de manière équilibrée car le nombre d'individus par famille est compris entre 9 et 36 arbres (tableau 9, annexe 3, figure 25). Les écartements entre les arbres, et donc la densité, ne sont plus réguliers. Les blocs contiennent entre 3 et 10 arbres, sur les douze initiaux, sur une surface par bloc de 108 m², soit des densités comprises entre 170 à 925 tiges par hectare.

1.2. DESCENDANCES ETUDIÉES

Des fruits ont été récoltés sur 41 arbre-mères en novembre 1998. Ils sont issus de la saison de floraison 1997. Le choix de ces arbres a tenu compte de leur origine, de leur aptitude à fructifier, de leur répartition dans le verger et de la possibilité d'accéder à la cime. La composition de l'échantillon est présentée sur le plan en annexe 3. Mis à part la famille 6, pour laquelle aucun arbre n'a été récolté, le nombre d'individus échantillonnés par famille va de 1 à 9 arbres soit 6 à 32 % de l'effectif des familles.



Figure 26. Vue de l'essai de descendances d'*E. grandis*,
4 mois après la plantation - station de Mahela



Figure 27. Vue de l'essai de descendances d'*E. grandis* 18 mois après la plantation - station de Mahela

Pour chaque arbre, nous avons récolté des fruits sur plusieurs branches. Les grimpeurs ont abattu les branches et les fruits récoltés sur chacune d'elle ont été conservés dans une enveloppe après l'attribution d'une identification. Les enveloppes ont été placées dans une étuve à 35°C pendant 48 heures afin d'accélérer la déhiscence de l'opercule. Pour chaque lot, les graines ont été séparées des fruits et tamisées. Puis le nombre de fruits, leur poids et celui des graines ont été enregistrés. Par précaution, les lots ont été divisés en deux pour alimenter deux sites de pépinière (Antananarivo et Mahela, figure 22 page 40). La technique de pépinière décrite précédemment a été appliquée (premier chapitre, paragraphe 2.3.1.1, page 26) à la différence près que les jeunes plantules en germe n'ont pas été sélectionnées. Leur désignation a été réalisée au hasard, ceci pour constituer un échantillon représentatif de tous les événements de pollinisation aboutissant à une plantule viable. Le nombre de plantules repiquées en sachet dépassait largement le nombre d'individus nécessaires à l'étude. Un deuxième tirage au hasard dans chacun des lots a désigné les plants retenus pour l'étude. Au final, sur les 41 arbre-mères, 30 ont été retenus, le reste était constitué par un nombre de plants trop faible (germination faible, mortalité après repiquage). Les 30 descendances ainsi produites pour notre étude, sont constituées de 20 à 60 individus.

Un essai de descendances a été mis en place à partir de ces plants. Il est situé sur la station de Mahela (figure 22 page 40) dans des conditions bioclimatiques relativement différentes de celles du verger. Ce site à 50 mètres d'altitude reçoit une pluviométrie annuelle moyenne de 2300 mm et la température annuelle moyenne est de 24°C. Le dispositif statistique est du type blocs complets avec 4 répétitions. Dans chacun des blocs, les familles sont représentées par une parcelle expérimentale correspondant à une ligne de 5 plants. Le nombre de plants nécessaires par descendance est donc de 20. L'écartement à la plantation est de 3 mètres sur la ligne et de 4 mètres entre les lignes de plantations. De fait, les interactions entre les traitements devraient être minimisées ou intervenir tardivement. L'orientation des lignes de plantations est parallèle à la course du soleil, ceci pour favoriser l'éclairage des houppiers et limiter la concurrence pour la lumière entre les différents traitements. La technique de plantation est similaire à celle décrite précédemment. La plantation a eu lieu en mai 1999. Les plants ont reçu, un an après la plantation, 100 g de NPK (11-16-20) par pied. Les soins apportés à cet essai montrent tout le potentiel de cette espèce dans les conditions de la station de Mahela (figures 26 et 27).

Tableau 10. Caractères mesurés lors des différents inventaires du verger à graines

Caractère	Age d'inventaire (mois)					
	27	40	61	102	126	156
Hauteur	X	X	X	X	X	X
Circonférence au collet				X		X
Circonférence à 1,3 m	X	X	X	X	X	X
Hauteur de 1 ^{ère} branche					X	
Nombre de branches	X					
Rayon maximal du houppier					X	

2. OBSERVATIONS EFFECTUEES DANS LE VERGER A GRAINES

2.1. INVENTAIRES FORESTIERS

Les caractères mesurés de 27 à 156 mois sont présentés dans le tableau 10. L'inventaire à 61 mois a été réalisé avant la sélection et l'abattage des arbres non retenus. Les données d'inventaires sont traitées dans l'objectif de décrire la variabilité intra-spécifique des caractères de croissance en fonction de la structure de la population et d'estimer certains paramètres génétiques.

Les forestiers utilisent classiquement, la hauteur totale, la circonférence à 1,3 mètre et le volume. Nous ne disposons pas de tarif de cubage, permettant le calcul du volume d'un arbre, adapté à cette espèce et spécifique au milieu d'étude. L'estimation du volume a donc été réalisée avec la formule de Pressler :

$$V \text{ (dm}^3\text{)} = ((130 \times G \text{ (cm}^2\text{)} + 1/3 \times G \text{ (cm}^2\text{)}) \times (H \text{ (cm)} - 130) / 1000$$

G étant la surface terrière des arbres à 1,3 mètre ($G = \text{circonférence}^2 / 4 \times \text{PI}$)

Le développement du houppier de chaque arbre a été estimé par la mesure de sa hauteur (hauteur totale déduite de la hauteur de première branche) et de sa projection au sol dans les huit directions géographiques.

2.2. OBSERVATIONS SUR LA FLORAISON

2.2.1. Description du développement floral

Nous allons décrire le développement floral de l'*E. grandis* caractéristique de la zone d'étude. Ceci nous permettra d'expliquer les étapes de la pollinisation contrôlée. Les différents stades floraux d'une fleur d'*Eucalyptus grandis* sont décrits sur la figure 15 (page 28). Dans les conditions écologiques de notre site d'étude, les premiers bourgeons floraux apparaissent vers le mois de février. Un mois et demi après le début de leur développement, ils sont bien individualisés et leur croissance a provoqué la chute des bractées. Une calotte, nommée premier opercule (correspondant au calice), se distingue au sommet de chaque bouton. En grossissant, l'anneau calicinal (délimitation entre le deuxième opercule correspondant à la corolle et le réceptacle), apparaît plus distinctement. Les étamines sont recourbées sur elles-mêmes dans le bouton floral.

Le début de l'anthèse, correspond au jour 1. Il démarre quand l'opercule prend une teinte jaune et se détache sous la poussée causée par l'élongation rapide du style et des étamines. Ceci se produit en l'espace d'un à deux jours (stade 1, figure 15). Les étamines se déploient (stade 2, figure 15), dès leur libération, pour être complètement épanouies les jours 2-3. Dès lors, au contact avec l'air ambiant, les sacs polliniques s'ouvrent avec une production concomitante de nectar. Les étamines restent dressées un à deux jours (stade 3, figure 15). Elles commencent à se flétrir et se détachent du staminophore au moment où la teinte jaune des anthères passe au brun (jours 4-5). La surface nectarifère prend une couleur plus prononcée virant au jaune vif et la production de nectar est maximale (stade 4, figure 15). Aux jours 6-7, le stigmate arrive à maturité en gonflant légèrement, et le suc produit à sa surface lui donne un aspect brillant. La fin de la période de fécondation est marquée par l'apparition, à la base du style, d'une zone d'abscission de couleur brune. En cas de fécondation, 9 à 10 jours après l'ouverture de la fleur, le style tombe après apparition d'une zone d'abscission à sa base. Dans le cas contraire, le style se flétrit mais reste dressé et peut se maintenir jusqu'à la chute de la fleur.

Pendant le développement du fruit, le réceptacle grossit et se lignifie. Après trois à quatre mois les capsules contenant les graines sont totalement lignifiées. Les valves carpellaires restent en place tant que le fruit reste attaché à la branche. Il est courant de voir, sur même un arbre, deux à trois générations de fruits. En revanche, après la récolte des fruits, les valves s'ouvrent rapidement sous l'effet du soleil et de l'air ambiant.

2.2.2. Observations phénologiques

L'observation individuelle de la phénologie des arbres constitue la première étape nécessaire à la description des flux de gènes. Il s'agit d'évaluer l'évolution, au cours de la période de floraison, des populations gamétiques potentielles.

Avant ces travaux, en l'absence d'observations précises sur la fructification, nous avons récolté, en 1998, deux types de fruits totalement distinguables correspondant à deux niveaux de maturation. Nous avons considéré que ces fruits étaient issus de la floraison de 1998 et que la différence de maturité correspondait aux fleurs produites soit en début de saison soit à la fin. Après vérification, nous avons constaté que les deux types de fruits correspondaient respectivement à deux années de floraison : 1997 et 1998 ; les descendants étudiés étant produits en 1997. Dès lors, il aurait été fort utile d'avoir les observations phénologiques durant cette

Tableau 11. Echantillonnage des descendance pour l'étude de la production semencière

Provenances	Verger à graines		Echantillonnage	
	Familles	Nb demi-frères	Nb d'arbre	Taux (%)
Andranokobaka	1	31	6	19
	2	30	6	20
	3	22	6	27
Atherton	4	36	8	22
	5	9	5	55
Tinaroo	6	16	3	19
	7	13	3	23
	8	17	6	35
Ravenshoe	9	25	6	24
	10	33	5	15
Paluma	11	8	6	75
Total général		242	60	25

période. Toutefois, ne disposant pas de ces données et pour vérifier, en plus, sa répétabilité, nous avons observé la floraison du verger de 1998 à 2001. En février 1998, sur tous les arbres du verger, nous avons noté ceux portant des capsules indiquant, par-là, les individus qui avaient fructifié et donc fleuri en 1997. Néanmoins, ces individus sont susceptibles d'avoir fleuri les années antérieures puisque les fruits persistent plusieurs années dans le houppier. Les relevés de floraison effectués en 1998 sont incomplets car ils ont été effectués tardivement et ils présentent des imprécisions sur la fin de la floraison, ne permettant pas de considérer ces données de façon complète. Nous garderons seulement l'information sur les arbres ayant fleuri ou non.

Pour l'ensemble des inventaires phénologiques annuels, nous avons effectué, au moyen de jumelles (grossissement 10x), des relevés tous les 3 à 5 jours pendant la période de floraison. Nous avons noté les informations individuelles sur la présence ou l'absence de fleur à chaque relevé et nous en avons déduit les dates du début et de la fin de floraison. Il n'a pas été possible de quantifier la variabilité intra arbre, ni l'intensité de la floraison en raison des difficultés d'observations (taille des fleurs, hauteur des arbres). Nous avons considéré qu'un arbre était en floraison entre deux relevés consécutifs pour lesquels nous avons observé des fleurs. Le raisonnement est identique en cas d'absence de fleurs. De ces données brutes, nous avons déduit la durée individuelle de floraison, la précocité (en fleur avant le 115^{ème} jour de l'année) ou la tardiveté (en fleur après le 185^{ème} jour de l'année) pour chaque arbre du verger qui seront exploitées dans notre analyse.

2.2.3. Etude de la production grainière du verger à graines

La récolte du matériel végétal a été conduite au mois de novembre 1999 (Ramanatoandro 2000). Une étude exhaustive sur les 242 arbres du plateau central n'était pas possible du simple fait que certains arbres ne fructifiaient pas et que pour d'autres, l'accès au houppier était impossible. Nous avons retenu un sous-ensemble de 60 arbres en prenant soin de constituer un échantillon représentatif du verger. Le choix des arbres a tenu compte de leur fructification, de la possibilité d'accéder aux branches et des arbres échantillonnés pour l'étude de paternité. Trois à huit arbres par famille ont été choisis (tableau 11). Deux types de fruits ont été considérés : i) les fruits dans les parties non feuillées des rameaux correspondant à la floraison de 1998 ; ii) les fruits situés dans les parties terminales des rameaux correspondant à la floraison de 1999. Sur chaque arbre échantillonné, les récoltes ont été effectuées sur 2 branches. Ce schéma a conduit à la constitution de 200 lots au total.

Une étude plus précise a été effectuée sur 3 arbres du verger (n°99 famille n°3 provenance Andranokobaka, n°124 famille n°8 provenance Tinaroo et n°182 famille n°4 provenance Atherton). Les fruits ont été récoltés et conservés individuellement depuis la récolte jusqu'aux tests de germination.

Après la récolte, les fruits sont traités de la même manière que précédemment (paragraphe 1.2 page 51). Le nombre de fruits et le poids total de fruits par lot sont enregistrés, ainsi que le poids de graines. Pour chaque lot, les dimensions des capsules (hauteur, largeur) sont notées pour un échantillon de 20 capsules prises au hasard. Nous avons effectué des tests de germination sur les lots de graines en laboratoire. La germination est définie comme l'émergence des cotylédons et de la radicule. Ceci indique l'aptitude de la graine à donner une plantule conforme (ISTA, 1985) que l'on définit comme graine viable. Les différents stades de la germination sont l'imbibition de la graine, l'émergence de la radicule, son allongement, la sortie des cotylédons et la chute du tégument.

Ces tests en laboratoire présentent l'avantage de contrôler les conditions et de se conformer aux normes établies (ISTA, 1998) utilisées en routine par le Sngf. Elles préconisent d'effectuer les tests de germination sur un échantillon de 100 graines permettant d'évaluer la capacité germinative à partir du pourcentage de semences viables. Mais dans le cas de la plupart des eucalyptus, notamment *E. grandis*, la séparation des graines viables du reste est fastidieuse et leur taille rend difficile leur comptage. Nous avons donc décidé d'appliquer une méthode basée sur des tests de germination pour 100 mg de graines prélevées sur chaque lot tiré au hasard et ceci répété 4 fois.

Pour tous les tests, les graines ont été réparties uniformément sur un disque de papier buvard placé dans une boîte de Pétri. La quantité d'eau nécessaire pour l'imbibition est ajoutée au début de l'essai et, pour minimiser l'évaporation, les boîtes sont scellées avec un film transparent. Le papier buvard permet, dans chaque boîte, d'homogénéiser la disponibilité en eau et d'assurer une alimentation hydrique continue. Les conditions optimales de température prescrites par l'ISTA ont été suivies (20-30 °C et hygrométrie supérieure à 70%). Les comptages sont effectués tous les 3 ou 4 jours jusqu'au 21^{ème} jour en éliminant au fur et à mesure les plantules enregistrées. A la fin du test, les graines non germées sont comptabilisées.

Pour les lots de graines récoltés par capsules séparées, nous avons pesé chacune d'elles ainsi que



Figure 28. Piège à insectes installé dans le verger à graines - vue de dessous

le poids des graines qu'elles renfermaient. Les tests de germination ont été effectués de la même manière que précédemment.

2.2.4. Piégeage et identification des insectes pollinisateurs

Compte tenu du rôle majeur des insectes dans la pollinisation des eucalyptus, et en dépit des difficultés rencontrées, nous avons choisi d'aborder, même sommairement, ce sujet. Dans notre situation, les études précises sur l'efficacité pollinisatrice des insectes auraient demandé des moyens trop importants. La hauteur des fleurs, par rapport au sol, aurait nécessité des travaux d'échafaudage lourds et coûteux. De plus, les eucalyptus ne constituent pas un bon modèle pour ce genre d'étude car : i) les fleurs sont hermaphrodites et protandres ; ii) elles sont regroupées en inflorescences et ne fleurissent pas simultanément ; iii) tous les stades floraux sont présents au même moment sur une même branche ; iv) les fleurs sont extrêmement fragiles et les manipulations d'émasculature sont particulièrement délicates pour cette espèce.

Compte tenu de ces raisons et pour des questions de temps, notre choix s'est restreint à évaluer la richesse spécifique en insectes pollinisateurs dans le verger et à expliquer, dans la mesure du possible, les résultats d'analyse de paternité à partir du comportement connu des insectes identifiés. Les identifications ont été réalisées à Madagascar par une équipe conjointe du Fofifa-Dra (Département Recherche Agronomique) et du PBZT (Parc Botanique et Zoologique de Tananarive) mené par M. Rajaonarison Jocelyn du Fofifa-Dra.

Deux modes de piégeage ont été utilisés. Le premier, réalisé en 2000, est une simple capture, sur les fleurs, au filet à papillon, répétée plusieurs fois dans la journée. Le deuxième, réalisé en 2001, s'est inspiré d'un mode de piégeage passif. Pendant deux semaines en période de floraison, un grand filet en tissu de type moustiquaire (maille 1 x 1 mm) formant un double entonnoir vertical été disposé au niveau des houppiers (figure 28).

2.2.5. Fécondations contrôlées

La pollinisation contrôlée permet de répondre à plusieurs objectifs dont le principal est d'obtenir des individus issus de croisement entre deux géniteurs déterminés. Pour les eucalyptus, cette technique a été décrite en 1951 par Pryor (cité par Bouvet 1982) en Australie puis utilisée dans les

pays où sont menés des travaux d'amélioration génétique et de production d'hybrides interspécifiques (Bouvet 1982). La pollinisation contrôlée nécessite d'avoir identifié, au préalable, les stades optimaux pour l'émasculature, la collecte de pollen et la fécondation. Elle permet de nombreuses applications :

- réaliser des croisements qui ne pourraient se produire en conditions naturelles du seul fait des décalages phénologiques ;
- réaliser des plans de croisements dans le cadre des travaux d'amélioration génétique ;
- étudier les phénomènes pré-zygotiques de la fécondation ;
- effectuer des croisements entre individus d'espèces différentes pour la production d'hybrides interspécifiques ;
- évaluer l'efficacité pollinisatrice maximale par saturation en pollen du stigmate, qui nous intéresse plus particulièrement ;
- produire, à moyenne échelle, des semences améliorées.

Pour les eucalyptus, la technique de pollinisation contrôlée comporte 4 étapes principales : la récolte de pollen, son conditionnement, l'émasculature des fleurs, et la pollinisation proprement dite.

Les rameaux florifères sont récoltés sur les branches abattues. Ils peuvent être conservés une semaine, en veillant à leur alimentation en eau. Ce qui permet d'effectuer plusieurs récoltes de pollen au fur et à mesure de la maturité des boutons floraux. Les boutons arrivés à maturité sont détachés, l'opercule est éliminé en appuyant légèrement sur la zone calicinale. A l'aide d'une lame de rasoir, les étamines sont détachées et recueillies dans un tamis. L'ensemble est placé dans une étuve pendant 12 heures à 35 °C, puis le pollen est récupéré. Ensuite, il est placé sous vide dans des piluliers fermés hermétiquement. Ainsi conditionné, le pollen se conserve plus d'une année à -20°C (Bouvet 1982).

Lors des croisements entre individus peu éloignés, fructifiant à la même période, les étamines sont récoltées et placées au soleil une à deux heures avant la pollinisation, permettant la libération du pollen. Celui-ci est appliqué immédiatement sur les fleurs prêtes à être pollinisées.

Pour un rameau donné, l'émasculature demande un examen attentif. En effet plusieurs stades floraux sont présents simultanément. Seules les inflorescences ne portant que des boutons couverts par l'opercule sont conservées. Le choix du rameau est important car l'élimination de

Tableau 12. Caractères mesurés lors des différents inventaires de l'essai de descendance

Caractère	Age d'inventaire (mois)				
	9	12	24	30	37
Hauteur	X	X	X	X	X
Circonférence au collet	X	X		X	X
Circonférence à 1,3 m		X	X	X	X
Circonférence à 2,0 m				X	X

fleurs épanouies dans une inflorescence limite le maintien des autres fleurs. Après avoir ôté l'opercule des fleurs au stade 1, les étamines sont retirées au moyen d'une pince fine en prenant soin de ne pas blesser les différents tissus. Les rameaux portant les fleurs émasculées sont ensachés au moyen d'un sac de mousseline maintenu par une armature constituée d'un fil de fer enroulé en spirale autour du rameau. Les sachets sont contrôlés chaque jour, et au fur et à mesure de leur évolution, toutes les fleurs sont émasculées. Les boutons les plus tardifs sont éliminés.

Cinq jours après l'émasculature, la viabilité du pollen conservé est évaluée par un test de germination *in vitro* sur milieu gélosé (1 %) en présence de saccharose (20%). Après ce contrôle, il est appliqué sur les stigmates au moyen d'un petit pinceau en répétant l'opération un jour plus tard. Le sac est retiré quand tous les styles sont tombés et qu'aucune nouvelle fécondation n'est possible. Le comptage des capsules est effectué depuis l'émasculature jusqu'à leur récolte qui intervient 5 à 6 mois après la fécondation.

3. OBSERVATIONS EFFECTUEES SUR LES DESCENDANCES

3.1. INVENTAIRES FORESTIERS

Des mesures ont été réalisées à 9, 12, 24, 31 et 37 mois. Le type des données d'inventaires est reporté dans le tableau 12. Elles concernent les caractères de croissance (hauteur, circonférences).

3.2. VARIABLES TRANSFORMEES

L'estimation du volume repose sur la formule précédemment citée (cf. deuxième chapitre, paragraphe 2.1, p 50).

4. MARQUEURS MOLECULAIRES

Vingt marqueurs microsatellites étaient disponibles et cartographiés pour *E. grandis* et *E. urophylla* au démarrage de cette étude (Brondani *et al.* 1998). Depuis, leur nombre a significativement augmenté (Nest 2000, Steane *et al.* 2001, Brondani *et al.* 2002). La technique initiale reposait sur l'amplification, par PCR, d'un fragment d'ADN à partir d'une seule paire d'amorce, la migration des fragments sur gel d'acrylamide et leur révélation au nitrate d'argent. Le criblage des 20 paires d'amorces a permis de retenir 5 marqueurs microsatellites (Embra06, Embra10, Embra11,

Embra13, Embra19) dont l'amplification donnait des résultats interprétables sur gel d'acrylamide après coloration (Razafiarivelo 2000). Néanmoins, compte tenu du nombre d'individus à analyser, nous avons cherché à optimiser l'acquisition des données. L'accès au séquenceur (Abi Prism) du Cirad-emvt a permis d'adapter la technique de PCR basée sur le multiplexage des amorces et l'amélioration du rendement des travaux en ajoutant un sixième marqueur (Embra15).

En dehors d'Embra06 et d'Embra11, les loci sont situés sur des groupes de liaison différents. Ces deux loci sont considérés comme indépendants car la distance qui les sépare est supérieure à 50 cM (Brondani *et al.* 1998). Les méthodes et techniques sont décrites par Chaix *et al.* (2002).

5. ANALYSES DES DONNEES - MODELISATION

Nous avons fait appel à des analyses spécifiques aux données recueillies. Il s'agit d'une part des données phénotypiques de la population parentale ou des descendants, issues des inventaires forestiers réalisés sur le terrain, et d'autre part des données microsatellites, sur ces mêmes individus, pour l'évaluation des paramètres de diversité génétique et la recherche en paternité.

5.1. ANALYSE DES DONNEES ET ESTIMATION DES PARAMETRES

GENETIQUES

5.1.1. Analyses quantitative et qualitative

Plusieurs modèles d'analyses de la variance ont été adaptés aux dispositifs et aux données relatives à la croissance et à la reproduction. Ils permettent d'estimer les variances liées aux effets génétiques, celle liée aux effets environnementaux, de désigner les effets significatifs et de comparer les moyennes des différents traitements à l'aide du test de Newman et Keuls.

Modèle d'analyse de la variance pour la population parentale

Le dispositif d'origine est en blocs complets randomisés mono-arbre et concerne les 12 familles de demi-frères. Avant l'éclaircie sélective, les données ont été traitées par un modèle d'analyse de la variance à trois critères de classification en utilisant le modèle mixte. Nous verrons dans le troisième chapitre les modifications apportées à l'analyse des données après l'éclaircie. L'effet

Tableau 13. Paramètres de l'analyse de la variance concernant la population parentale

Source de variation	ddl	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	Estimation des CM
Provenance	p-1=4	SCP = $\Sigma(y_{i...}-y_{...})^2$	CMp = SCP/(p-1)	$\sigma_E^2 + b\sigma_b^2 + fb\sigma_p^2$
Famille/prov.	(f-p)=6	SCf(p) = $\Sigma(y_{j...}-y_{...})^2$	CMf(p) = SCF/(f-p)	$\sigma_E^2 + b\sigma_b^2 + p\sigma_{f(p)}^2$
Bloc	(b-1)=19	SCb = $\Sigma(y_{...k}-y_{...})^2$	CMb = SCB/(b-1)	$\sigma_E^2 + b\sigma_b^2$
Résiduelle	(f-1)(b-1)=144	SCR = $\Sigma(y_{j...k}-y_{j...k} + y_{...})^2$	CMe = SCR/(f-1)(b-1)	σ_E^2
Total	bpf-1=172			

Tableau 14. Paramètres de l'analyse de la variance concernant la population de descendants

Source de variation	ddl	Somme des carrés des écarts	Moyenne de la somme des carrés	Espérance des CM
Descendance	d-1=29	SCd = $\Sigma_i (y_{i...}-y_{...})^2$	CMd = SCd/(d-1)	$\sigma_e^2 + n\sigma_{d/b}^2 + nf\sigma_b^2$
Bloc	b-1=3	SCb = $\Sigma_j (y_{...j} - y_{...})^2$	CMb = SCb/(b-1)	$\sigma_e^2 + n\sigma_{d/b}^2 + nb\sigma_d^2$
Interaction	(d-1)(b-1)=87	SCi = $\Sigma_{ij} (y_{ij...} - y_{i...} - y_{...j} + y_{...})^2$	CMi = SCi/(d-1)(b-1)	$\sigma_e^2 + n\sigma_{d/b}^2$
Résiduelle	db(n-1)=476	SCR = $\Sigma_{ijk} (y_{ijk} - y_{ij...})^2$	CMr = SCR/db(n-1)	σ_e^2
Totale	dbn-1=595	SCt = $\Sigma_{ijk} (y_{ijk}-y_{...})^2$		

n étant le nombre de plants par parcelle unitaire

famille est hiérarchisé dans le niveau provenance. Le modèle mathématique dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 13 est le suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + \chi_i + \gamma_j(p) + \alpha_k + \varepsilon_{ijk}$$

Où :

Y_{ijk} est la valeur pour le caractère considéré de la famille j de la provenance i dans le bloc k

μ = la moyenne de l'essai

χ_i = l'effet aléatoire de la provenance i de variance σ_p^2 , $i = 1, \dots, p$

γ_j = l'effet aléatoire de la famille j dans p de variance $\sigma_{f/p}^2$, $j = 1, \dots, f$

α_k = l'effet fixe du bloc k, $k = 1, \dots, 40$

ε_{ijk} = l'erreur résiduelle de variance σ_e^2

Modèle d'analyse de variance pour la population de descendants

Le dispositif de comparaison des 30 descendances est en blocs complets randomisés avec des parcelles unitaires de 5 plants. Il est analysé par le modèle d'analyse de la variance à deux critères de classification en utilisant le modèle mixte et en considérant les interactions descendances blocs. Le modèle mathématique est le suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_j + \alpha_i + \beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Où :

Y_{ijk} est la valeur pour le caractère considéré de la descendance j dans le bloc i

μ = la moyenne de l'essai

γ_j = l'effet aléatoire de la descendance i de variance σ_d^2 , $i = 1, \dots, d$

α_i = l'effet fixe du bloc j, $j = 1, \dots, 4$

β_{ij} = l'effet milieu de l'interaction du bloc j et de la descendance i de variance $\sigma_{d/b}^2$

ε_{ijk} = l'erreur résiduelle de variance σ_e^2

Les caractéristiques de l'analyse de la variance sont présentées dans le tableau 14.

5.1.2. Rappel des notions d'héritabilité

L'héritabilité est définie comme étant la part de la variabilité due aux effets génétiques par rapport à la variabilité totale (effets génétiques et effets de l'environnement). L'espérance des carrés moyens tirée de l'analyse de la variance permet d'estimer l'héritabilité compte tenu de certaines

hypothèses de base :

- reproduction panmictique dans la population d'origine ;
- absence de plein-frères et d'individus issus d'autofécondation dans les familles ;
- absence d'épistasie, de liaison génétique, de consanguinité au niveau des semenciers.

Les diverses variances nécessaires aux estimations ont été obtenues au moyen de la procédure Varcomp (SAS) par la méthode du maximum de vraisemblance.

L'héritabilité au sens large s'obtient par $h^2_G = \sigma_G^2 / \sigma_P^2$ correspondant au rapport de la variance génétique totale à la variance phénotypique. Plus pratiquement, dans le cas de la population parentale et des descendants, la covariance entre demi-frères est en relation avec la variance additive et elle est égale à la variance entre les moyennes des familles soit :

$$\text{COV HS} = 1/4 \sigma_A^2 \text{ (variance additive) et } \text{COV HS} = \sigma_f^2 \text{ d'où } \sigma_f^2 = 1/4 \sigma_A^2$$

L'héritabilité au sens strict au niveau individuel et au niveau famille se déduit par :

$$h^2_G = 4\sigma_f^2 / (\sigma_f^2 + \sigma_e^2)$$

$$h^2_{fm} = \sigma_f^2 / (\sigma_f^2 + \sigma_e^2 / k)$$

où k est la moyenne harmonique du nombre d'individus par famille, qui donne une idée de l'efficacité de sélection au niveau famille et des potentialités de gain que l'on obtiendrait si l'on parvenait à reproduire les familles de manière identique à elles-mêmes, en récoltant à nouveau sur les arbre-mères par exemple.

5.2. PRINCIPES DE L'ANALYSE DE PATERNITE

Toutes les procédures qui aboutissent à la détermination des pères, pour chaque descendant étudié dans notre échantillon, sont réalisées à partir du Logiciel FaMoz développé par le Laboratoire d'Amélioration Génétique Forestière de l'INRA (Gerber *et al.* 2000). Ce programme permet d'effectuer les analyses de parenté selon que l'on recherche les deux parents ou le père en connaissant la mère. Les étapes de l'analyse sont les suivantes :

- calcul des fréquences alléliques, dans la population parentale, effectué au niveau de chaque

Tableau 15. Probabilités d'exclusion de paternité dans un système à 2 allèles codominants

Couples mère-enfant	Probabilités	Pères incompatibles	Probabilités	Probabilités d'exclusion
AA.AA	p^3	aa	q^2	p^3q^2
AA.Aa	p^2q	AA	p^2	p^4q
Aa.AA	p^2q	aa	q^2	p^2q^3
Aa.Aa	pq	--	--	--
Aa.aa	pq^2	AA	p^2	p^3q^2
aa.Aa	pq^2	aa	q^2	pq^4
aa.aa	q^3	AA	p^2	p^2q^3
$EP = p^3q^2 + p^4q + p^2q^3 + p^3q^2 + pq^4 + p^2q^3$				
<p>La probabilité d'exclusion est calculée par la somme de la dernière colonne</p>				

locus ;

- calcul des probabilités d'exclusion ;
- calcul des LOD scores des pères potentiels pour la désignation du ou des pères les plus probables ;
- simulations de populations de descendants à partir de tirages aléatoires dans la population parentale, afin de déterminer les seuils critiques de décision par rapport aux LOD scores ;
- estimation du flux de gènes caché.

5.2.1. Probabilité d'exclusion

La probabilité d'exclusion (EP pour « exclusion probability ») désigne la capacité d'un marqueur génétique à exclure une relation entre deux ou plusieurs individus et détermine donc l'efficacité des analyses de parenté. Elle est calculée à partir des fréquences alléliques de la population parentale. Le calcul des probabilités d'exclusion, pour des marqueurs codominants (microsatellites), se réfère aux travaux de Jamieson et Taylor (1997). Trois types de probabilités d'exclusion peuvent être calculés : i) le plus courant concerne la recherche en paternité quand la paire mère-descendant est comparée avec un père potentiel ; ii) le second compare un parent à un descendant en n'ayant aucune information sur l'autre parent ; iii) le troisième s'effectue quand une paire de parents est comparée au descendant. Dans notre cas, la démarche est de déterminer, parmi une population de géniteurs connus, le père d'un descendant à partir de son génotype multilocus et de celui de sa mère. Un exemple pour un locus bi-allélique d'un marqueur codominant est donné dans le tableau 15.

La probabilité d'exclusion pour des marqueurs codominants EP_1 à un locus donné l est calculée selon la formule suivante (Jamieson et Taylor 1997) :

$$EP_1 = 1 - 2a_3 + a_3 + 3(a_2a_3 - a_3) - 2(a_2^2 - a_4)$$

où $a_k = \sum_{i=1}^{A_0} (p_i)^k$ et p_i est la fréquence de l'allèle i au locus l .

Dans le cas de L loci multialléliques et indépendants, et dans une population panmictique en équilibre, la probabilité d'exclusion totale est calculée par :

$$EP = 1 - \prod_{l=1}^L (1 - EP_l)$$

5.2.2. Calcul des LOD scores

Quand il est impossible d'exclure tous les pères pour n'en garder qu'un seul, nous passons par une étape supplémentaire. L'objectif est d'attribuer une probabilité aux pères potentiels à partir des données moléculaires des descendants étudiés et de leurs mères respectives. Le calcul des LOD scores (logarithme d'un rapport de vraisemblances) pour tous les pères potentiels, est basé sur le rapport entre le maximum de vraisemblance d'un géniteur mâle parmi la population des géniteurs mâles connus pour le couple descendant-mère donné et le maximum de vraisemblance s'ils ne sont pas apparentés. Les pères potentiels sont classés selon leurs valeurs de LOD scores respectives, dont le principe de calcul est décrit ci-après.

La vraisemblance (L) d'une hypothèse (H) pour un type de donnée (D) s'écrit $L(H | D)$. La vraisemblance pour une hypothèse est évaluée par rapport à son alternative, soit le ratio de vraisemblance :

$$L(H_0, H_1 | D) = P(D | H_0) / P(D | H_1)$$

où $P(D | H_i)$ est la probabilité d'obtenir D sous l'hypothèse H_i .

Soit g_m , g_a et g_0 qui sont, respectivement, les génotypes de la mère (connue), du père supposé et du descendant à un locus. Pour chaque candidat père, deux hypothèses alternatives sont possibles : (H_0) le candidat est le vrai parent ; (H_1) le candidat n'est pas le vrai parent. La vraisemblance que la mère et le père soient les parents du descendant s'exprime par :

$$L(H_0 | g_m, g_a, g_0) = T(g_0 | g_m, g_a) \cdot P(g_m) \cdot P(g_a)$$

où $T(g_0 | g_m, g_a)$ est la probabilité du génotype d'un descendant donné selon les génotypes de la mère et du père supposé sous l'hypothèse mendélienne. $P(g_m)$ et $P(g_a)$ sont les fréquences des génotypes des deux parents dans la population.

La vraisemblance que le père soit choisi au hasard :

$$L(H_1 | g_m, g_a, g_0) = T(g_0 | g_m) \cdot P(g_m) \cdot P(g_a)$$

Le ratio de vraisemblance est donc :

$$L(H_0, H_1 | g_m, g_a, g_0) = T(g_0 | g_m, g_a) \cdot P(g_m) \cdot P(g_a) / T(g_0 | g_m) \cdot P(g_m) \cdot P(g_a) = T(g_0 | g_m, g_a) / T(g_0 | g_m)$$

Pour plusieurs loci indépendants, on prend le logarithme du produit des ratios de vraisemblance

obtenus pour chaque locus, on parle alors de LOD score.

5.2.3. Simulation et seuils critiques

Compte tenu du mode de pollinisation, la population étudiée ne peut pas être considérée comme isolée. Les arbres adultes génotypés ne représentent qu'un sous-ensemble des parents mâles participant à la descendance. Quant la paternité ne peut être attribuée à aucun des génotypes parentaux connus, on considère que le gamète mâle provient de l'extérieur de la parcelle. Le flux de gènes total (GF : Gene Flow) peut donc être subdivisé en deux composantes différentes : le flux de gènes venant de l'extérieur du verger (GFO : Gene Flow Outside) et le flux de gènes à l'intérieur de celui-ci (GFI : Gene Flow Inside). Le GFO, estimé à partir de l'analyse de paternité, est probablement sous évalué car certains gamètes extérieurs sont indiscernables des gamètes internes à la parcelle correspondant ainsi à un flux de gènes cryptique (ou flux de gènes caché).

En utilisant les génotypes des 349 géniteurs au 6 loci microsatellites, deux jeux de 10 000 descendants sont générés à partir des fréquences alléliques en considérant l'autofécondation possible. Dans le premier jeu, les descendants sont générés aléatoirement à partir des allèles parentaux (seuls les génotypes parentaux sont possibles). Dans le deuxième jeu, chaque descendant est généré aléatoirement à partir des fréquences alléliques de la population parentale (tous les génotypes sont possibles). Ces simulations intègrent un taux d'erreur de 0,1% dans les données. Le principe consiste à remplacer dans l'échantillon, dans les limites du taux fixé, un allèle à un locus par un autre allèle tiré au hasard en fonction de la fréquence de chaque allèle à ce locus. Pour construire les tests statistiques et décider si un père peut être le vrai père, nous comparons les distributions des LOD scores du père le plus probable des descendants du jeu 1 à celui des descendants du jeu 2. Les LOD scores obtenus du jeu 1 représentent la distribution sous l'hypothèse nulle H_0 que le père est présent dans les individus génotypés tandis que les LOD scores du jeu 2 représentent la distribution sous l'hypothèse alternative H_1 que le père n'existe pas dans la population de géniteurs connus. L'erreur de type I (α , on rejette H_0 alors que c'est vrai) est réalisée quand aucun des pères génotypés n'a été assigné à un descendant du jeu 1. L'erreur de type II (β , on accepte H_0 alors que c'est faux) correspond au fait qu'un père génotypé est assigné à un descendant du jeu 2. Les niveaux de ces deux types d'erreurs dépendent de la valeur du seuil choisi du LOD score. Ce seuil permet de prendre les décisions suivantes : i) on garde H_0 quand le LOD score est au-dessus de ce seuil et on rejette H_0 s'il est inférieur. Afin de minimiser les deux types d'erreur et de connaître leur importance, le seuil est choisit à l'intersection des distributions

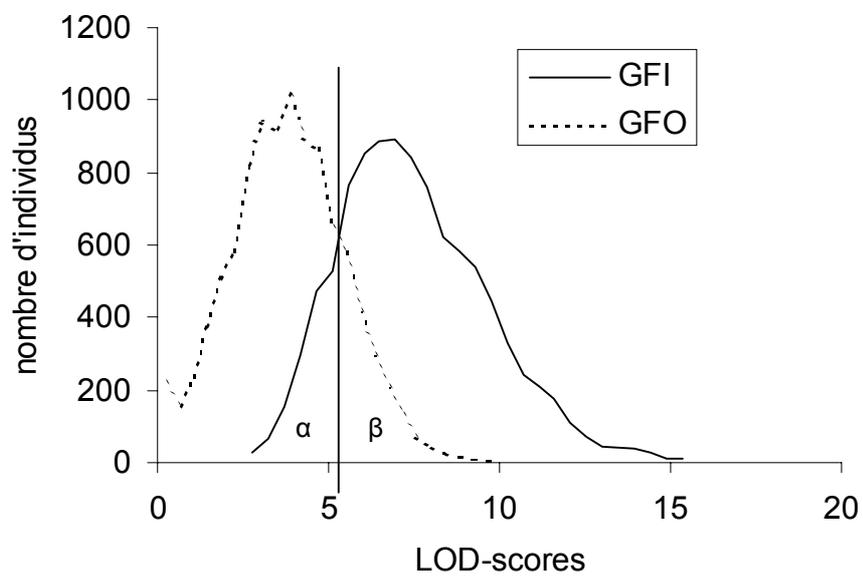


Figure 29. Distributions des LOD scores pour les deux populations simulées de descendants (en pointillé, la population simulée à partir des fréquences alléliques, en continu la population simulée à partir du tirage au hasard des allèles présents dans la population parentale, détermination du seuil au croisement des deux courbes, α : erreur de type 1, β : erreur de type II)

des jeux 1 et 2.

Pour tester la qualité des résultats précédents, nous simulons une population vraie où chaque descendant pourrait avoir 0, 1 et 2 parents parmi les parents génotypés. Nous générons ainsi 10 000 descendants en choisissant leurs parents au hasard parmi une population de 500 individus auxquels sont inclus les 349 parents du verger. Les allèles sont choisis au hasard sous la contrainte de leur fréquence dans la population réelle. Pour chaque descendant, nous effectuons les mêmes tests que précédemment en considérant que chaque parent ayant un LOD score supérieur au seuil prédéterminé est considéré comme un père probable. Les résultats sont comparés pour la population réelle et la population vraie. Nous déterminons ainsi : i) le GFO vrai c'est à dire le nombre de fois ou un père extérieur à la parcelle est attribué aux descendants ; ii) le GFO apparent le nombre de fois ou aucun père du verger n'est détecté dans la population simulée de descendants ; iii) et le « cryptic gene flow » ou flux de gène caché, c'est à dire la probabilité de confondre un père dans le verger avec un père n'appartenant pas à celui-ci.

5.2.4. Particularité et applications à notre échantillon

Sur les 851 descendants étudiés, 127 présentaient un génotype moléculaire incompatible avec celui de la mère dont ils étaient théoriquement issus et ce quel que soit le locus. L'origine de ces problèmes d'identification demeure inconnue et les erreurs de manipulations sont possibles depuis la récolte jusqu'au dépôt sur les gels d'acrylamide. La source d'erreur la plus probable vient des travaux en pépinière ou les planches de semis pour nos échantillons étaient contiguës avec d'autres lots de graines non utilisés.

La figure 29 montre la distribution des LOD scores dans les populations de descendants générées par les deux simulations. L'intersection de ces courbes nous permet de fixer un seuil de LOD score et de représenter les erreurs de type I et II. Dans notre cas, le seuil choisi est de 5. Au-dessus de cette valeur, nous retenons le père ayant la valeur de LOD score la plus élevée parmi les différents candidats. Si celui de tous les candidats est inférieur au seuil nous n'en retenons aucun et nous considérons que le père n'appartient pas au verger.

5.3. DIVERSITE GENETIQUE ET STRUCTURATION DES POPULATIONS

La diversité génétique d'une population est appréciée par différents notions : le nombre d'allèles par locus, la proportion observée d'hétérozygotes confrontée à celle attendue selon la loi de Hardy Weinberg et la structuration génétique dans la population. Nous avons utilisé les logiciels Genepop (Raymond et Rousset 1995) et Genetix 4.02 (Genetix 2001) pour évaluer ces différentes caractéristiques.

5.3.1. Hétérozygotie

Le taux d'hétérozygotes est calculé de la manière suivante :

Soit A_o : le nombre d'allèles observés par locus et
 A_e : le nombre d'allèles efficaces par locus ($A_e = \frac{1}{1 - H_e}$)

H_o étant l'hétérozygotie observée dont le taux correspond à la fréquence des génotypes hétérozygotes dans une population donnée.

H_e correspond à l'hétérozygotie de Nei calculée par $H_e = 1 - \sum_i p_i^2$, où p_i est la fréquence de l'allèle i . Cette hétérozygotie calculée est une valeur théorique qui correspond à l'hétérozygotie attendue d'une population en la supposant à l'équilibre de Hardy Weinberg.

Les écarts à la panmixie dans une population pour un locus donné s'estiment par l'écart entre le taux d'hétérozygotes observé (H_o) et le taux d'hétérozygotes attendu (H_e) soit :

$$F = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

5.3.2. Structuration et diversité génétique des populations

La réduction d'hétérozygotie est liée à plusieurs facteurs que ce soit le mode de reproduction, la dérive génétique ou l'effet Walhund. Ce dernier traduit le fait qu'en mélangeant plusieurs sous-populations en équilibre, dont les fréquences alléliques sont différentes, on observe sur l'ensemble un déficit en hétérozygotes par rapport à l'équilibre de Hardy Weinberg. Les taux d'hétérozygotie sont ainsi utilisés pour mesurer la différenciation entre les sous-populations. Mais le déficit en hétérozygotes peut avoir une autre origine notamment lorsque les sous-populations ne sont plus en équilibre pour diverses raisons liées au régime de reproduction, à la consanguinité

ou à la dérive génétique dans les populations.

Le niveau et la distribution de la diversité génétique à l'intérieur et entre les populations sont estimés par des statistiques de Nei (1978). Notamment le F_{ST} qui est l'indice de fixation qui exprime la subdivision de la variabilité génétique des populations. Pour les loci multialléliques nous utiliserons ici le G_{ST} qui est une généralisation de F_{ST} calculée par $G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$ où H_T l'hétérozygotie théorique dans la population totale et H_S l'hétérozygotie moyenne des sous-populations en panmixie. La variation génétique des populations est quantifiée par les distances génétiques, mesurées comme la différence des fréquences alléliques entre deux populations (Nei 1972).

A partir de l'identification du nuage pollinique pour la descendance échantillonnée dans le verger nous serons en mesure d'identifier les événements conduisant aux écarts à la panmixie :

- autofécondation et croisements entre apparentés ;
- flux de pollen venant de l'extérieur de la population.

TROISIEME PARTIE
RESULTATS

TROISIÈME CHAPITRE - RESULTATS

Les résultats sont présentés en trois parties concernant respectivement la description de la population parentale (partie 1), l'estimation des flux de gènes dans le verger à graines (partie 2), les conséquences de ces flux sur l'évolution de la diversité génétique et sur la valeur de la descendance (partie 3). Nous reprenons les résultats principaux en fin de partie par une conclusion. L'ensemble de ces résultats sera discuté dans le quatrième et dernier chapitre du document.

La randomisation des génotypes à l'intérieur des vergers à graines et le dispositif de type monoarbre cherchent à favoriser les croisements entre individus d'origines géographique et génétique différentes. Mais la question est de savoir : i) Quelle est la variabilité des caractères de croissance et de floraison dans la population parentale ?, ii) Jusqu'où la randomisation et les interactions entre individus affectent-elles le phénotype et le comportement des arbres ?, iii) Cela conduit-il à des croisements préférentiels entre individus d'une même strate ? En fait, il s'agit de déterminer les facteurs et leurs interactions, entre le phénotype de l'arbre et sa phénologie, susceptibles de structurer, directement ou indirectement, les flux de gènes. En d'autres termes, nous cherchons à mettre en évidence, si elle existe, une hiérarchisation des individus dans le verger.

1. DESCRIPTION DE LA POPULATION PARENTALE

Dans cette partie, après avoir identifié l'origine des arbres de bordure, jusque là inconnue, nous allons décrire le verger à graines sous plusieurs aspects abordés séparément :

- la variabilité génétique et la structuration des géniteurs à partir des données moléculaires ;
- l'impact de la sélection sur la composition et l'état du verger ;
- la croissance des géniteurs en relation avec la structuration génétique de la population ;
- la phénologie du verger sur plusieurs années d'observation ;
- la production grainière d'un sous-ensemble du verger.

Tableau 16. Effectifs des provenances et des familles du verger à graines d'*E. grandis*

Provenance / numéro famille	Effectifs plateau central	Effectifs bordure	Effectifs totaux	Pourcentage dans le verger
Andranokobaka	83	93	176	50,4
1	31	24	55	15,8
2	30	56	86	24,6
3	22	13	35	10,0
Atherton	45	2	47	13,4
4	36	0	36	10,3
5	9	2	11	3,1
Tinaroo	46	0	46	13,2
6	16	0	16	4,6
7	13	0	13	3,7
8	17	0	17	4,9
Ravenshoe	59	3	62	17,8
9	25	0	25	7,2
10	34	3	37	10,6
Paluma	9	1	10	2,8
11	9	1	10	2,8
Inconnu	0	8	8	2,3
Totaux	242	107	349	100

1.1 IDENTIFICATION DES ARBRES DE BORDURES

Au moment de la plantation, l'identité des arbres de bordure n'a pas été notée. Néanmoins sur la plupart d'entre eux, nous avons pu récolter des feuilles à partir des rejets émis quelques mois après l'abattage effectué en 1998. Nous avons retrouvé leur origine à partir de leurs génotypes microsattellites en les comparant à ceux des arbres du plateau central, constituant la population de référence. Dans notre cas, nous savions que les arbres de bordures avaient la même origine que ceux du plateau central, il s'agissait d'assigner les individus à une origine ou à une famille. Cette approche, basée sur les calculs de maximum de vraisemblance, et plus spécialement sur la méthode Bayésienne, permet d'assigner efficacement, avec relativement peu de marqueurs, un individu à une population donnée (Cornuet *et al.* 1999, Rannala et Mountain 1999). Nous avons utilisé le logiciel GeneClass2 développé par le Cirad (Beaudoin comm.pers.).

Il s'agit de répondre à la question "quelle est, parmi n populations de référence, celle qui a le plus de chances d'être à l'origine de l'échantillon ou de l'individu que nous testons". Pour y répondre, la méthode bayésienne assigne une probabilité à chaque population. Plus la probabilité d'une population est proche de 1, et plus l'individu a de chance d'y appartenir et de n'avoir aucune relation avec les autres.

Nous avons pu, grâce à cet outil, retrouver l'identité (provenance et famille) de 99 arbres sur 107 avec un taux d'erreur inférieur à 5%. De fait, la composition du verger a été revue (tableau 16). Une bonne part d'entre eux, plus de 50%, appartient à une seule famille n°2 de la provenance d'Andranokobaka. Ces résultats sont concordants avec la proportion importante de plants en pépinière de cette famille après la plantation du plateau central et du fait que l'on utilise les « fonds de pépinière » pour constituer les bordures des essais.

Tableau 17. Paramètres de diversité sur les 6 loci microsatellites des géniteurs du verger à graines regroupés par provenance

Locus	Provenances	N	A _o	A _e	H _o	H _e	F
Embra06	Andranokobaka	166	15	4,6	0,898	0,783	-0,137 n.s.
	Atherton	90	7	4,1	0,800	0,756	-0,058 n.s.
	Tinaroo	92	7	3,5	0,630	0,717	0,114 *
	Ravenshoe	116	12	7,2	0,983	0,862	-0,147 n.s.
	Paluma	18	7	3,9	1,000	0,744	-0,371 n.s.
Total pour Embra06		482	21	6,4	0,851	0,842	-0,010 n.s.
Embra10	Andranokobaka	164	11	7,5	0,915	0,866	-0,058 n.s.
	Atherton	90	7	4,1	0,822	0,756	-0,093 n.s.
	Tinaroo	92	8	3,1	0,695	0,674	-0,033 n.s.
	Ravenshoe	118	11	4,2	0,763	0,763	-0,011 n.s.
	Paluma	18	6	5,3	0,889	0,811	-0,103 n.s.
Total pour Embra 10		468	14	6,3	0,817	0,850	0,036 n.s.
Embra11	Andranokobaka	166	12	2,8	0,530	0,639	0,166 *
	Atherton	90	6	1,7	0,333	0,400	0,174 *
	Tinaroo	92	7	3,1	0,761	0,674	-0,117 n.s.
	Ravenshoe	116	10	3,4	0,759	0,707	-0,075 n.s.
	Paluma	18	3	2,0	0,667	0,500	-0,352 n.s.
Total pour Embra11		472	17	2,9	0,598	0,656	0,090 *
Embra13	Andranokobaka	166	9	2,3	0,687	0,566	-0,210 **
	Atherton	90	8	3,5	0,867	0,711	-0,214 ***
	Tinaroo	92	6	1,8	0,478	0,435	-0,084 n.s.
	Ravenshoe	118	9	1,8	0,559	0,458	-0,206 n.s.
	Paluma	18	5	3,1	1,000	0,678	-0,478 **
Total pour Embra13		472	19	2,6	0,661	0,591	-0,120 ***
Embra15	Andranokobaka	118	11	4,5	0,305	0,780	0,608 ***
	Atherton	88	6	3,4	0,568	0,705	0,196 ***
	Tinaroo	88	12	6,3	0,568	0,841	0,319 ***
	Ravenshoe	114	15	7,1	0,684	0,860	0,210 *
	Paluma	16	6	4,7	0,875	0,788	-0,126 n.s.
Total pour Embra15		412	20	8,3	0,538	0,882	0,392 ***
Embra19	Andranokobaka	166	7	3,0	0,675	0,663	-0,017 n.s.
	Atherton	90	4	1,4	0,311	0,311	-0,001 n.s.
	Tinaroo	92	6	1,8	0,326	0,457	0,273 *
	Ravenshoe	116	5	2,3	0,328	0,569	0,423 ***
	Paluma	18	3	2,4	0,556	0,578	0,048 n.s.
Total pour Embra19		464	10	2,6	0,452	0,618	0,271 ***
Tous les loci	Andranokobaka	156	10,8 (65)	3,4	0,668	0,708	0,083 ***
	Atherton	89	6,3 (38)	2,5	0,617	0,605	-0,007 ***
	Tinaroo	91	7,7 (46)	2,7	0,576	0,628	0,084 ***
	Ravenshoe	116	10,3 (62)	3,4	0,679	0,703	0,034 ***
	Paluma	18	5,0 (30)	3,2	0,831	0,684	-0,215 n.s.
		470	16,8 (101)	3,8	0,674	0,740	0,089

N : nombre total d'allèles, A_o : nombre observé d'allèles par locus, A_e : nombre efficace d'allèles, H_o : taux d'hétérozygotie observé, H_e : taux d'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse d'Hardy et Weinberg, F : déficit en hétérozygotie = 1 - (H_o/H_e), n.s., *, **, *** : non significatif au seuil de 5%, significatif au seuil de 5, 1, 0,1%

1.2 DIVERSITE GENETIQUE ET STRUCTURATION DU VERGER A GRAINES

Une partie de ces résultats repose sur les travaux effectués par Razafiarivelo (2000) et Razafimaharo (2001).

1.2.1 Diversité allélique

Dans notre échantillon, les loci Embra13, Embra19, Embra11 présentent des distributions déséquilibrées dans lesquelles un allèle a une fréquence allélique supérieure à 0,5. Un à deux autres allèles ont des fréquences intermédiaires et les restants sont en fréquence très basse. A l'opposé, les loci Embra06, Embra10 et Embra15 montrent une distribution allélique plus équilibrée. Six à sept allèles ont des fréquences comprises entre 0,05 et 0,2 (annexe 4). La présence d'allèles rares est commune à tous les loci, leur évolution entre les deux générations sera discutée plus loin.

Les données moléculaires obtenues dans la population parentale confirment le niveau élevé de polymorphisme des marqueurs microsatellites et particulièrement pour ceux que nous avons retenus. Le nombre total d'allèles de la population pour les 6 loci confondus est de 101 (tableau 17). Le nombre moyen d'allèles par locus est de 16,8, il varie de 10 (Embra19) à 21 (Embra06). La diversité génétique des différentes provenances, révélée par ces marqueurs, est élevée. Elle est comprise entre 0,576 et 0,831 pour une valeur moyenne de 0,674.

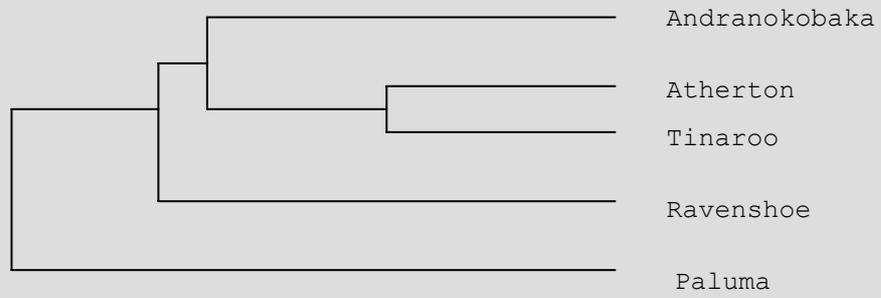
1.2.2 Structuration de la population

Par rapport à ce que nous devons attendre sous l'équilibre de Hardy Weinberg, nous observons un déficit en hétérozygotes dans les provenances de Ravenshoe (3,4%), Andranokobaka (8,3%) et Tinaroo (8,4%) et un excès d'hétérozygotes dans les provenances d'Atherton (<1%) et Paluma (21%). En dehors de la provenance Paluma, constituée par un faible nombre d'individus, ces déviations sont significatives au seuil de 5%.

Au niveau des loci, on observe un déficit en hétérozygotes pour Embra10 (3,6%), Embra11 (9%), Embra19 (27%) et Embra15 (39%) un excès d'hétérozygotes pour Embra06 (1%), Embra13 (12%). Ces écarts, par rapport à ce que l'on attend sous l'hypothèse de Hardy Weinberg, sont significatifs pour Embra11, Embra13, Embra15 et Embra19 au seuil de 5%. Les déficits observés

Tableau 18. Distances génétiques entre les provenances (Nei 1972)

	Andranokobaka	Atherton	Tinaroo	Ravenshoe	Paluma
Andranokobaka	0	0,309	0,287	0,380	0,479
Atherton		0	0,177	0,369	0,263
Tinaroo			0	0,299	0,441
Ravenshoe				0	0,646



sur les loci Embra15 et Embra19 pourraient s'expliquer par la présence d'allèles nuls.

La variabilité génétique entre les populations est estimée à 8,9%. En conséquence, la diversité intra-population représente l'essentiel de la variabilité, soit plus de 90%. La comparaison des distances génétiques distingue toutes les provenances en regroupant Tinaroo et Atherton avec Andranokobaka puis Ravenshoe et enfin Paluma (tableau 18). Cette dernière est celle qui se différencie le plus des autres.

1.3 CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT

Dans ce chapitre nous décrivons l'architecture du verger à graines à partir de ses caractéristiques de croissance et de forme. Nous mesurerons les effets de la sélection sur la structure génétique du peuplement et les répercussions que cela peut avoir en terme de flux géniques.

1.3.1 Description et impacts de la sélection effectuée à 5 ans

1.3.1.1 Rappels des objectifs de la sélection

L'efficacité d'une sélection dépend de son intensité et de la variabilité du caractère considéré dans la population. Ici, le verger est constitué par du matériel végétal « sauvage » (provenances australiennes) et du matériel végétal issu de sélections (provenance malgache) qui sont susceptibles de présenter un niveau de variabilité important. Le choix de la densité initiale de plantation d'un verger dépend de la fertilité du terrain, du comportement en peuplement de l'espèce, de la sylviculture appliquée et du taux de sélection souhaité. En augmentant la densité de plantation, les interventions seront plus nombreuses et le taux de sélection plus élevé. Le régime des éclaircies dépend de la croissance juvénile, la première sera plus précoce si la croissance juvénile est forte. Mais, Bouvet (1995) a montré que la sélection n'était efficace qu'à partir de 3,5 ans moment où les effets génétiques sont supérieurs aux effets du milieu. Les décisions d'intervention dépendent donc de plusieurs facteurs et l'on cherchera à trouver le meilleur compromis.

Les stratégies de croissance des géotypes pouvant être différentes, certains individus ont une croissance juvénile plus élevée, à l'opposé, d'autres démarrent plus lentement mais croissent plus longtemps. Dans notre dispositif, en bloc monoarbre, chaque individu est soumis à la compétition directe de son voisinage. Sans éclaircie, les individus à faible croissance initiale seraient « surcimés » et les différences individuelles exacerbées. L'analyse des données de croissance intégrerait alors dans les effets génétiques ceux liés à l'environnement dont la compétition entre individus. L'intervention en éclaircie limite une trop forte compétition entre les individus. Plusieurs types de dispositifs et de méthodes de sélection, propres aux vergers à graines, ont été élaborés. Leurs objectifs sont d'arriver à un compromis entre l'équilibre des géotypes dans le verger et leur répartition spatiale. Les éclaircies sélectives sont, généralement, au nombre de 4-5, régulières, leurs taux de sélection se situent entre 30 et 50%. Ceci permet de

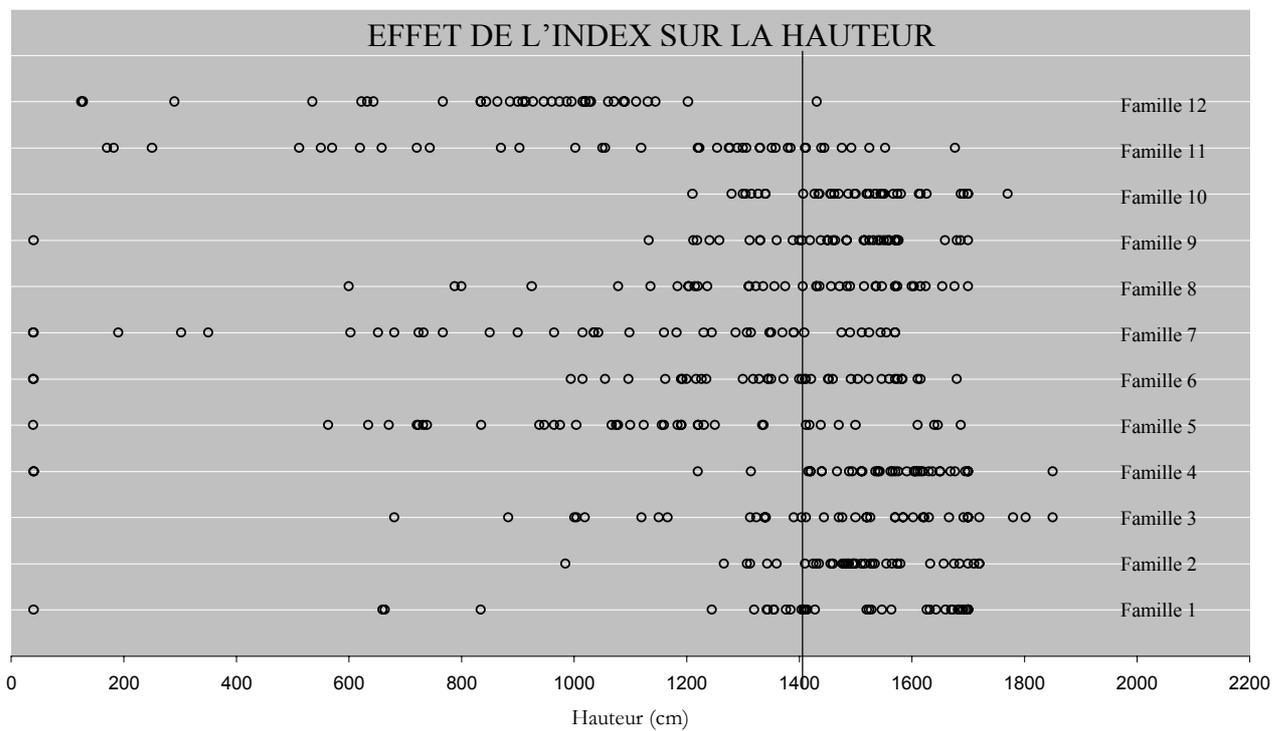
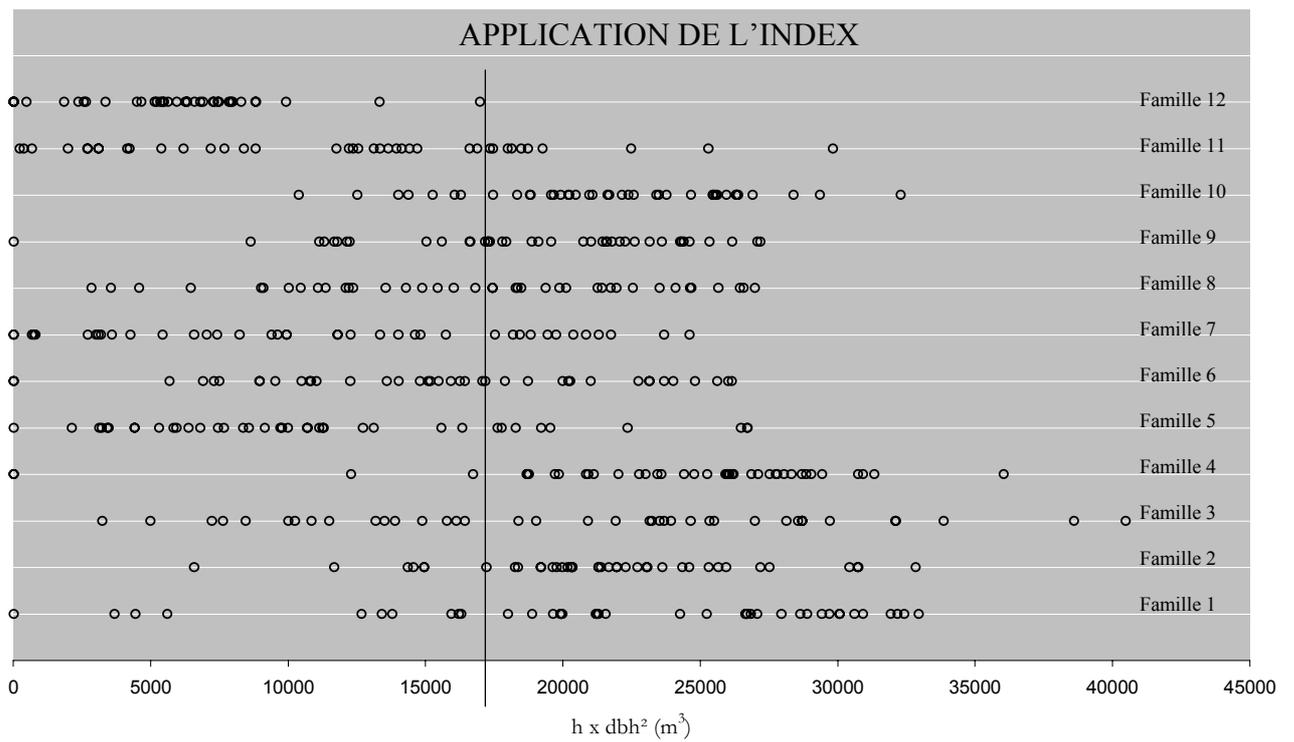


Figure 30. Application de l'index de sélection par famille et conséquence sur la hauteur (l'index est calculé par la valeur $h \times dbh^2$)

répondre à la fois aux objectifs de sélection, tenant compte de l'expression tardive des effets génétiques, des règles sylvicoles de l'espèce et de la gestion du recru herbacé.

Pour ces raisons, la densité initiale du verger était de 1 111 tiges par hectare. Cette densité permet d'aboutir, après plusieurs éclaircies sélectives, à une densité finale de 150 à 200 tiges par hectare. Les interventions sont déclenchées avant que les arbres n'entrent en compétition. La seule sélection effectuée, dans ce verger, à 5 ans était équivalente à une sélection massale basée sur le phénotype des arbres. La désignation des arbres à éliminer était basée sur un index de sélection élaboré à partir du diamètre à 1,3 mètre (dbh) et de la hauteur totale (h) qui avaient été mesurés au préalable. Chaque individu s'est vu attribuer une note individuelle, sous la forme d'un simple index de type $dbh^2 \times h$. Une fois classés sur cet index, tous les individus se trouvant en dessous de 17500 (correspondant à un taux de sélection de 50% pour la population) ont été éliminés par simple abattage (figure 30). Les caractéristiques qualitatives, de branchaison, de forme, et l'état sanitaire sont appréciés de visu et permettent d'éliminer certains arbres mal conformés (Lebot 1992).

1.3.1.2 Impact des travaux d'éclaircie sur la composition du verger

Ce mode de sélection a conduit d'une part à déséquilibrer le nombre d'individus par famille et par provenance et à homogénéiser le phénotype moyen des arbres. Le taux de sélection varie de 10 à 100% selon les familles (tableau 9 page 51). Il est plus élevé dans les familles constituées par une majorité d'arbres co-dominant et dominés. En conséquence, tous les arbres de la famille 12 ont été éliminés et le nombre actuel d'individus par familles varie de 9 à 36. Les parts relatives des provenances d'Andranokobaka et de Ravenshoe, initialement de 25 et 17%, sont passées respectivement à 34 et 24% (ou 50 et 18% en tenant compte des arbres de bordure). Celles d'Atherton, Tinaroo (25%) et de Paluma (8%) sont maintenant, respectivement de 18, 19, et 4% (13, 13 et 3% en tenant compte des arbres de bordure).

La sélection a donc complètement perturbé la répartition spatiale des arbres dans le verger. Les blocs, initialement composés de 12 individus, renferment entre 3 et 9 arbres (annexe 3). En conséquence, les effets de compétition sont différents d'un arbre à un autre, dans la mesure où le nombre de plus proches voisins varie entre 1 et 7 sur les 8 initiaux. De façon certaine, ces effets ont une influence sur la croissance des arbres et le développement de leur houppier avec des impacts probables sur la phénologie et la constitution des populations gamétiques.

Tableau 19. Résultats de l'analyse de la variance et comparaison des valeurs familiales moyennes du verger de 27 à 156 mois

HAUTEUR TOTALE (cm)

Famille	27	40	61 ave	61 ape	61 e	Gain	102	126	156
1	757 ab	1209 a	1484 ab	1573 ab	1110	6	1728 a	2039 ab	2432 ab
2	756 ab	1180 a	1500 ab	1535 abc	1361	2	1647 a	1995 ab	2402 ab
3	773 ab	1158 a	1443 ab	1590 a	1264	10	1738 a	2116 a	2481 a
4	813 a	1224 a	1558 a	1580 ab	1426	1	1668 a	2027 ab	2440 ab
5	526 cd	865 b	1128 c	1524 abc	1001	35	1578 ab	1852 b	2367 ab
6	719 ab	1110 a	1373 b	1527 abc	1262	11	1600 ab	1933 ab	2282 cd
7	554 cd	914 b	1109 c	1471 bc	921	33	1554 ab	1917 ab	2190 cd
8	695 b	1090 a	1363 b	1534 abc	1193	12	1670 a	1880 b	2362 ab
9	781 ab	1193 a	1467 ab	1518 abc	1377	3	1664 a	2003 ab	2387 ab
10	759 ab	1195 a	1502 ab	1532 abc	1294	2	1566 ab	1906 ab	2300 bc
11	585 c	893 b	1094 c	1434 c	992	31	1456 b	1840 b	2131 d
12	471 d	756 c	888 d	-	888	0	-	-	-
Moy.	687	1072	1326	1541	1093	15	1643	1955	2374
CV (%)	17	15	16	3	16	-	5	4	5
F _p	26,72 ***	36,40 ***	43,59 ***	-	-	-	5,76 ***	4,44 **	5,57 ***
F _{famille(p)}	13,89 ***	13,04 ***	13,67 ***	-	-	-	1,67 n.s.	1,54 n.s.	1,68 n.s.

CIRCONFERENCE (cm)

Famille	27	40	61 ave	61 ape	61 e	Gain	102	126	156
1	27 ab	37 ab	46 ab	51 a	29	10	67 a	73 a	82 a
2	27 ab	36 ab	44 ab	46 ab	36	5	58 a	61 b	72 ab
3	27 ab	35 ab	43 b	51 a	33	19	67 a	74 a	82 a
4	28 a	39 a	50 a	50 a	41	18	66 a	73 a	80 a
5	18 cd	24 d	28 d	44 b	24	54	55 ab	56 b	62 bc
6	24 ab	30 c	36 c	45 b	30	23	55 ab	61 b	62 bc
7	18 cd	25 d	30 d	43 b	23	44	52 ab	58 b	60 c
8	21 b	31 c	37 c	43 b	30	18	54 ab	56 b	64 bc
9	26 ab	34 bc	41 bc	44 b	34	9	56 a	64 ab	68 bc
10	26 ab	36 ab	45 ab	46 ab	34	3	58 a	57 b	67 bc
11	20 c	25 d	29 d	42 b	25	44	51 b	54 b	60 c
12	12 d	17 e	19 e	-	19	0	-	-	-
Moy.	23	31	37	47	27	23	58	62	76
CV (%)	22	22	25	5	21	-	10	12	13
F _p	35,59 ***	48,01 ***	30,79 ***	-	-	-	13,09 ***	13,26 ***	12,56 ***
F _{famille(p)}	10,55 ***	15,20 ***	0,77 n.s.	-	-	-	3,82 **	4,64 ***	4,06 ***

VOLUME INDIVIDUEL (dm³)

Famille	27	40	61 ave	61 ape	61 e	Gain	102	126	156
1	29 ab	81 a	153 ab	180 a	47	18	376 a	497 a	797 a
2	27 ab	71 ab	135 cb	146 ab	91	8	278 abc	325 b	588 abc
3	20 a	73 ab	137 cb	186 a	76	36	373 a	520 a	808 a
4	31 a	85 a	170 a	176 a	11	35	338 ab	482 a	738 ab
5	11 d	29 d	53 f	129 b	29	143	240 bc	261 b	445 c
6	21 bc	50 c	88 de	134 b	54	52	228 bc	322 b	417 c
7	12 d	36 d	58 ef	117 b	29	95	200 c	284 b	367 c
8	17 cd	52 c	92 d	127 b	57	38	226 bc	262 b	467 c
9	25 ab	63 bc	111 cd	132 b	73	19	241 bc	368 b	518 bc
10	25 ab	72 ab	135 cb	145 ab	68	7	257 bc	277 b	507 bc
11	14 d	34 d	60 ef	116 b	41	100	191 c	252 b	375 c
12	5 e	14 e	20 g	-	20	0	-	-	-
Moy.	21	55	101	151	46	45	268	350	558
CV (%)	40	41	46	17	49	-	24	29	30
F _p	12,85 ***	40,04 ***	39,06 ***	-	-	-	11,73 ***	13,79 ***	12,93 ***
F _{famille(p)}	4,85 ***	15,08 ***	16,46 ***	-	-	-	3,43 **	4,67 ***	3,95 ***

ave : avant éclaircie, ape : après éclaircie, e : produit éclaircie, gain = gain phénotypique, CV : coefficient de variation phénotypique
n.s., *, **, *** : non significatif au seuil de 5%, significatif au seuil de 5, 1, 0,1%

L'évolution des coefficients de variation des caractères de croissance intra-famille et pour la population totale sont reportés en annexe 5. Comme attendu, ces coefficients ont diminué en relation avec le taux de sélection appliqué aux familles traduisant l'homogénéisation des phénotypes. Les gains phénotypiques obtenus par la sélection étaient en moyenne compris en 15 et 45% selon le caractère considéré. Le classement des familles, basé sur les caractères de croissance, a été perturbé mais à 126 mois, le peuplement présentait une hiérarchisation établie et similaire.

1.3.2 Evolution des caractères de croissance et conséquences au niveau du houppier

L'âge de l'essai, au moment de l'étude, était de 126 mois (10 ans et demi). La hauteur moyenne des arbres atteignait 19,5 mètres pour un accroissement moyen de 1,9 m/an. Le diamètre moyen était de 20 cm, soit un accroissement moyen légèrement inférieur à 2 cm/an traduisant les effets de compétition entre voisins. La production annuelle moyenne du peuplement était estimée à 20 m³ha⁻¹ sur écorce. Ces résultats globaux soulignent le bon comportement de l'espèce malgré la fertilité moyenne du site. Leur comparaison avec les résultats présentés par Bouvet et Andrianiriana (1990) sur d'autres sites (40-45 mètres de hauteur, 70-80 m³ha⁻¹an⁻¹ à 14 ans) montrent que nous sommes dans une situation largement en dessous des potentialités de l'espèce.

Au moment de sa mise en place le dispositif était en blocs complets randomisés. Le modèle d'analyse de la variance est celui décrit dans le deuxième chapitre au paragraphe 5.1.1. Actuellement, les blocs sont incomplets et déséquilibrés. En effectuant une analyse basée sur les facteurs lignes et colonnes de plantation, nous avons déterminé des effets terrains significatifs. Pour limiter ces effets terrains, nous avons revu le dispositif en regroupant les 40 blocs 2 à 2 (blocs 1 et 2 = répétition 1, blocs 3 et 4 = répétitions 2, *etc.*) pour constituer au final 20 répétitions et nous avons ajusté les données initiales par rapport à ces effets terrains.

Pour la plupart des caractères de croissance, hauteur, circonférence et volume, les effets provenances et familles sont hautement significatifs quel que soit l'âge de la parcelle (tableau 19). Jusqu'à 61 mois, les différences entre les familles et les provenances sont essentiellement dues à la croissance inférieure des arbres originaires d'Eungella et de Paluma. Au-delà, les individus des provenances et des familles d'Andranokobaka et d'Atherton sont, de manière significative, plus productifs. A partir de 102 mois, les effets familles ne sont plus significatifs pour la hauteur. La

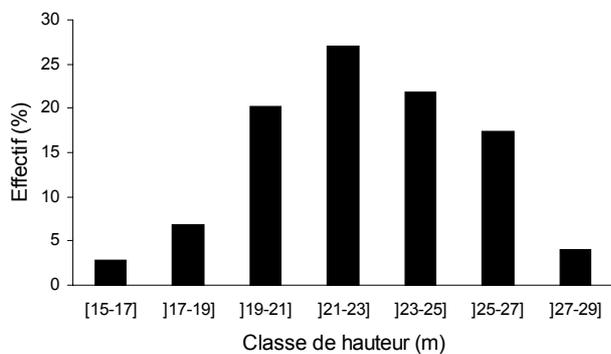


Figure 31. Distribution des géniteurs par classe de hauteur

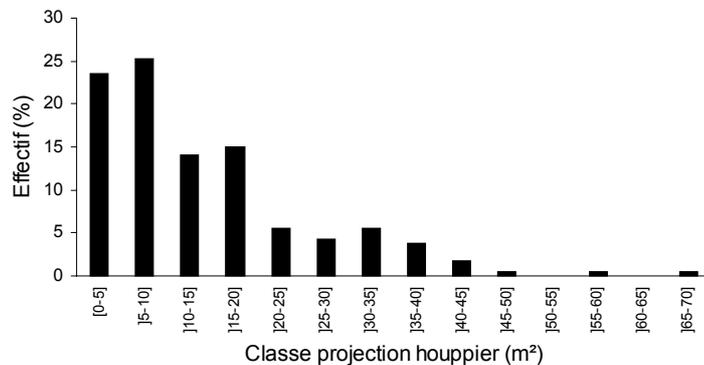


Figure 32. Distribution des géniteurs par classe de projection de houppier

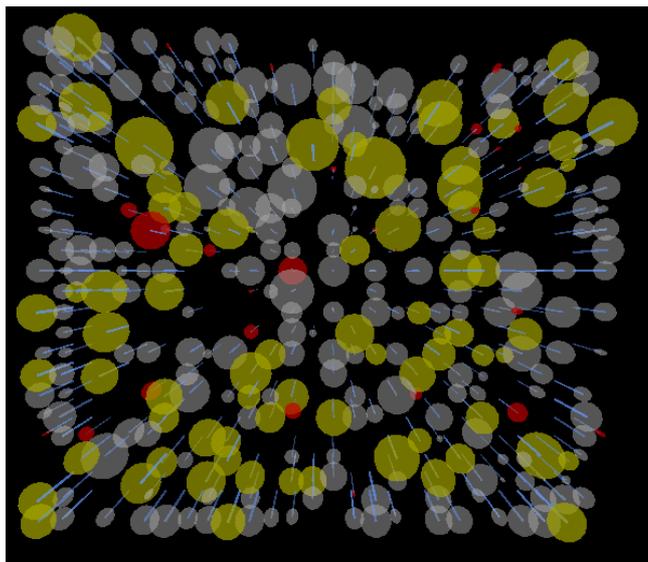


Image CAPSIS

Figure 33. Répartition des géniteurs dans le verger : taille du houppier et hauteur totale (rouge : Ht < 19m, blanc : 19m < Ht < 25m, jaune : Ht > 25m)

Tableau 20. Effets provenance et famille sur la forme du houppier - Comparaisons des moyennes par provenances et par famille

Effets	Projection du houppier (m ²)			Forme du houppier		
	Moyenne et écart type	Min	Max	Hauteur (m)	Nombre de branches	Volume
F _{provenance}	10,36 ***	-	-	5,42 ***	4,74 **	9,42 ***
Andranokobaka	18,9 ^a ± 13,5	0,3	65,6	9,1 ^a	14,2 ^{ab}	103 ^a
Atherton	16,6 ^a ± 11,8	1,0	44,8	9,0 ^a	14,9 ^a	85 ^a
Tinaroo	8,0 ^b ± 7,0	0,2	30,3	6,2 ^b	9,8 ^{bc}	32 ^b
Ravenshoe	10,2 ^b ± 7,5	0,4	40,0	7,2 ^{ab}	10,9 ^{abc}	45 ^a
Paluma	6,1 ^c ± 5,4	1,4	17,8	5,4 ^b	7,0 ^c	22 ^b
F _{famille(provenance)}	4,39 **	-	-	0,27 ^{n.s.}	2,99 **	2,08 *
1	24,9 ^a ± 15,1	0,3	65,6	9,3	16,1 ^a	136 ^a
2	13,4 ^{bc} ± 10,4	1,0	36,9	8,9	12,1 ^{ab}	76 ^{ab}
3	17,8 ^{ab} ± 12,1	1,1	45,1	8,9	14,5 ^a	96 ^{ab}
4	18,3 ^{ab} ± 11,9	1,1	44,8	9,1	16,2 ^a	90 ^{ab}
5	9,4 ^{bc} ± 8,3	1,0	23,8	8,6	9,4 ^{ab}	62 ^b
6	6,5 ^c ± 6,0	0,2	24,4	5,7	10,6 ^{ab}	24 ^b
7	8,6 ^{bc} ± 8,1	1,6	30,3	7,1	9,3 ^{ab}	40 ^b
8	8,9 ^{bc} ± 7,1	0,6	27,6	6,1	9,5 ^{ab}	35 ^b
9	10,6 ^{bc} ± 6,6	1,1	28,3	7,0	9,7 ^{ab}	46 ^b
10	8,9 ^{bc} ± 8,2	0,4	40,0	7,4	11,7 ^{ab}	45 ^b
11	6,1 ^c ± 5,4	1,4	17,8	5,4	7,0 ^b	22 ^b

(n.s., *, **, *** : non significatif au seuil de 5%, significatif au seuil de 5, 1, 0,1%)

variabilité est plus importante pour la circonférence et pour le volume (annexe 6). Le classement des moyennes permet de distinguer les familles 1, 3 et 4 du reste avec un effet plus marqué sur le volume. Les effets génétiques sont plus importants pour la croissance en circonférence et en volume.

Jusqu'à l'éclaircie et donc son élimination complète, la famille 12 se distingue des autres par une croissance nettement inférieure. Les familles 1 et 3 proviennent de 2 arbre-mères eux-mêmes originaires d'Atherton. Ces résultats confirment des observations antérieures qui avaient montré que la provenance d'Atherton était la plus adaptée au contexte bioclimatique de la région (Bouvet et Andrianirina 1990, Lebot et Ranaivoson 1994). Ces familles récoltées dans un essai de provenances sont le résultat des croisements entre origines géographiques différentes. Leur comportement est susceptible d'être influencé, aussi, par les effets d'hétérosis.

La forme du houppier et la hauteur des arbres sont les caractéristiques qui nous intéressent plus particulièrement. Elles devraient nous permettre de distinguer ou non, au niveau architectural, l'existence de groupes d'individus selon leur phénotype. Au niveau de la hauteur, la population montre une distribution quasi normale (figure 31). Les hauteurs individuelles sont comprises entre 15 et 29 mètres contribuant à l'hétérogénéité du peuplement. Nous avons vu qu'elle s'expliquait par des effets génétiques liés à la structuration de la population. En conséquence, nous observons une hiérarchisation architecturale liée à la présence de plusieurs groupes d'arbres mélangés pieds à pieds dans le verger : dominants (au-dessus de 25 mètres), dominés (au-dessous de 19 mètres) et codominants. Les familles 1, 3 et 4 se détachent des autres avec une mention particulière pour la famille 1 même si elle n'est pas significativement différente des deux autres (tableau 19 page précédente).

Nous nous focalisons principalement sur la projection au sol du houppier dont l'estimation est plus précise. Les figures 32 et 33 illustrent la variabilité existante dans le verger au niveau de ce caractère. Pour 18 géniteurs sur les 240 individus mesurés, la projection du houppier est inférieure à 1 m². En dehors de ce groupe d'arbres atypiques, les valeurs individuelles varient de 1-60. La moitié des géniteurs ont une projection de houppier inférieur à 10 m². La variabilité intra-famille est élevée, les coefficients de variation vont de 60 à 95% (tableau 20). En dépit de la variabilité individuelle, les effets provenances et familles sont significatifs sur la plupart des caractéristiques du houppier. Ces caractères permettent de distinguer trois groupes de provenances : Andranokobaka-Atherton aux houppiers bien développés situés dans la partie

Tableau 21. Coefficients de corrélation entre les caractères de croissance de la population parentale de 27 à 126 mois

	C41	C61	C102	C126	H27	H41	H61	H102	H126	Hh126	Ph126
C27	0,74	0,67	0,49	0,47	0,35	0,30	0,31	0,19	0,15	0,15	0,29
C41	-	0,87	0,74	0,67	0,26	0,33	0,49	0,27	0,22	0,29	0,39
C61		-	0,85	0,78	0,18	0,30	0,50	0,29	0,22	0,33	0,46
C102			-	0,91	0,13	0,21	0,43	0,35	0,27	0,41	0,54
C126				-	0,12	0,20	0,39	0,32	0,28	0,43	0,70
H27	Corrélations âge-âge (circonférence)				-	0,33	0,23	0,04	0,06	0,08	0,11
H41						-	0,41	0,08	0,15	0,11	0,14
H61							-	0,22	0,22	0,19	0,21
H102	Corrélations hauteur-circonférence							-	0,21	0,14	0,13
H126					Corrélations âge-âge (hauteur)				-	0,11	0,32
Hh126										-	0,44
Ph126					Corrélations houppier-hauteur-circonférence						-

C= circonférence, H= hauteur, Hh : hauteur du houppier, Ph : projection au sol du houppier, toutes les corrélations sont significatives au seuil de 5%

Tableau 22. Estimation des héritabilités calculées à partir des données de croissance du verger

Caractères	Héritabilité	27	40	61	102	126	156
Hauteur	h^2	0,96	0,97	0,98	0,83	0,77	0,82
	h^2_f	0,93	0,94	0,94	0,66	0,56	0,65
Circonférence au collet	h^2	-	-	-	-	-	-
	h^2_f	-	-	-	0,82	-	-
Circonférence à 1,3 mètres	h^2	0,97	0,98	0,97	0,92	0,92	0,92
	h^2_f	0,92	0,94	0,94	0,83	0,86	0,85
Volume	h^2	0,92	0,98	0,97	0,91	0,93	0,92
	h^2_f	0,76	0,94	0,94	0,82	0,86	0,84
Projection du houppier	h^2	-	-	-	-	-	0,77
	h^2_f	-	-	-	-	-	0,79

supérieure de la canopée, Tinaroo-Ravenshoe avec des houppiers deux fois moins importants et Paluma dont les arbres présentent un houppier très réduit. Les effets de compétition entre individus après l'éclaircie constituent très certainement l'effet environnemental principal lié à l'origine géographique des plus proches voisins.

Les corrélations phénotypiques juvénile-adultes sont nettement plus importantes et significatives pour la circonférence par rapport aux autres caractères de croissance (tableau 21). Aux mêmes âges, les corrélations entre la hauteur et la circonférence sont faibles, elles varient de 0,28 à 0,50. A 126 mois, les caractéristiques du houppier sont essentiellement corrélées avec la circonférence.

Avant l'éclaircie sélective, les valeurs d'héritabilités individuelles ou familiales liées aux caractères de croissance sont en moyenne de 0,94 (tableau 22). Ensuite, elles varient entre 0,56 et 0,93 et elles sont plus élevées pour la circonférence et le volume. A l'inverse de ce qui est attendu, l'héritabilité au niveau famille, qui englobe les effets génétiques additifs et non additifs, est inférieure à l'héritabilité au niveau individuel. Ces résultats montrent globalement que les sélections sur la circonférence sont plus efficaces et que la première sélection peut intervenir à partir de 40 mois.

Tableau 23. Taux annuel de floraison (%) des provenances et des familles

Provenance	1997	1998	1999	2000	2001	Famille	1997	1998	1999	2000	2001
Andranokobaka	88	96	95	78	96	1	84	94	97	77	97
						2	93	97	97	77	91
						3	86	100	91	82	95
Atherton	87	89	89	76	98	4	89	89	86	72	97
						5	78	89	100	89	100
Tinaroo	80	89	98	80	96	6	69	75	100	75	87
						7	92	92	100	85	100
						8	82	100	94	82	100
Ravenshoe	75	80	93	71	86	9	64	68	96	68	80
						10	82	88	91	74	91
Paluma	67	89	100	67	89	11	67	89	100	67	89
Moyenne	82	89	96	76	94						

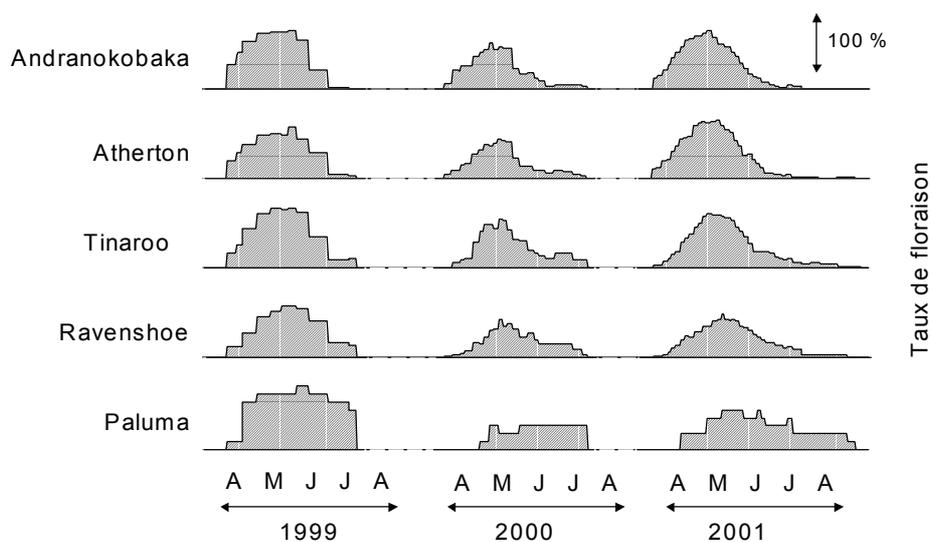


Figure 34. Spectre de floraison des différentes provenances du verger sur les 3 années d'observation

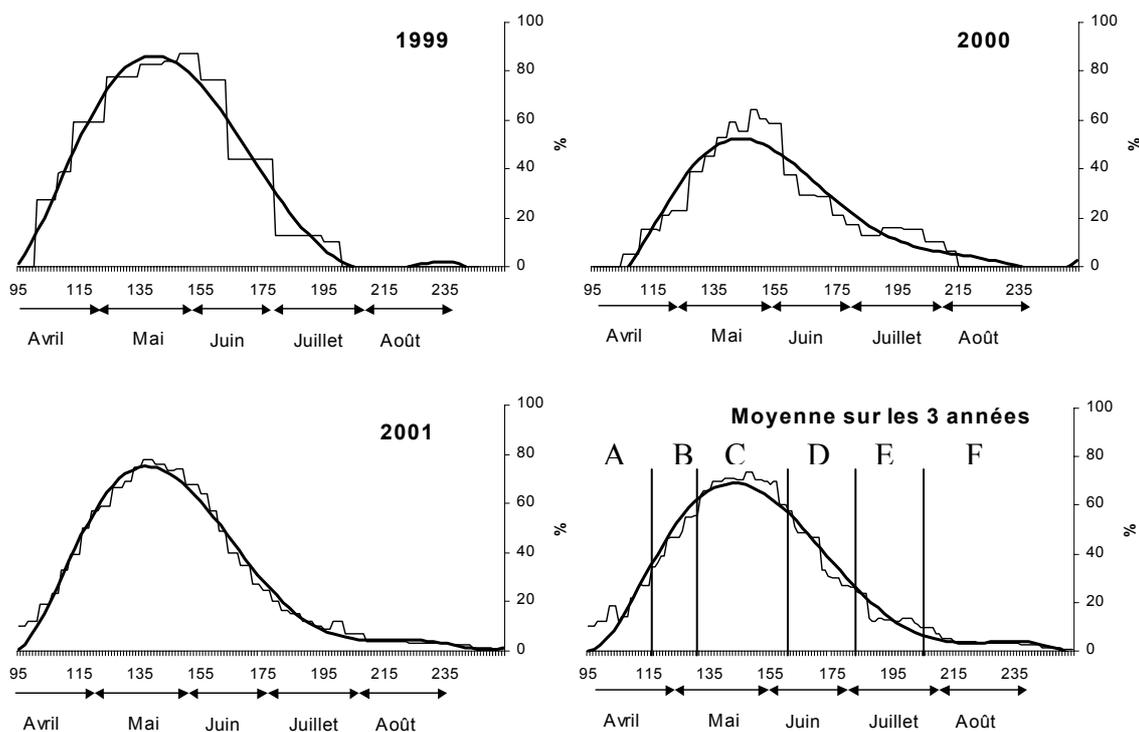


Figure 35. Taux annuels de floraison du verger et moyenne sur trois ans (les limites des périodes A, B, C, D, E et F correspondent aux taux de floraison dans le verger de 10, 30 et 60%)

1.4 DYNAMIQUE DE LA FLORAISON DU VERGER

En plus de la structuration observée dans le verger aux niveaux génétique, spatial et architectural, les conditions climatiques et les variations inter-annuelles contribuent aux variations phénologiques d'une espèce dans un milieu donné. Dans ce chapitre, nous décrivons le comportement général de la floraison du verger et la régularité annuelle de sa phénologie durant les trois années principales d'observations (1999-2001). Quand l'objectif est de diffuser des variétés, efficacement et à moindre coût, la qualité de la reproduction sexuée représente le facteur primordial. Pour la plupart des espèces d'eucalyptus plantées, la production abondante de capsules et de graines laisse supposer que la pollinisation et la fructification ne posent pas de problèmes majeurs. Néanmoins, plusieurs phénomènes peuvent intervenir et avoir un impact sur la qualité des variétés populations produites en pollinisation libre. Nous allons rechercher et décrire les facteurs principaux liés à la phénologie du verger.

1.4.1 Dynamique de la floraison

Durant la période d'observation, de 1998 à 2001, la floraison était régulière et bien établie. Le taux moyen de floraison sur l'ensemble du verger est de 85% (3 arbres n'ont jamais fleuri durant nos observations) avec des valeurs annuelles allant de 76 à 96% (tableau 23). Il se situe respectivement de 67 à 100% et de 64 à 100% au niveau des provenances et des familles. Les variations inter-annuelles sont les plus fortes pour les familles 9 et 11 constituées par un nombre plus faible d'individus. Toutes les provenances participent à la floraison du verger (figure 34). A ce niveau, nous ne constatons qu'un décalage de la floraison pour la provenance Paluma.

Les géniteurs sont en fleur du mois d'avril au mois de septembre. Individuellement, les arbres fleurissent sur une durée de 1 à 14 semaines avec une moyenne de 6 ou 7 semaines. Nous n'avons pas observé d'arbres fleurissant en dehors de cette période. Le pic de floraison se situe à la fin du mois du mai et plus de 50% des arbres du verger sont en floraison entre fin avril et fin juin (figure 35). Au niveau individuel, les durées annuelles moyennes de floraison sont, respectivement, de 55, 40 et 48 jours en 1999, 2000, 2001. Elles sont significativement différentes ($P < 0,0001$), mais la dynamique est identique et le pic de floraison ne varie que de 4 à 5 jours selon les années.

A partir de ces éléments, nous avons effectué un découpage de la saison de floraison en 6

Tableau 24. Résultats de l'analyse de variance des caractères de floraison et comparaison des moyennes familiales

Années	Effets	Début de floraison	Fin de floraison	Durée de floraison
1999	F _{provenance}	9,25 ***	13,59 ***	2,75 *
	Andranokobaka	118 ^b	174 ^c	56 ^b
	Atherton	125 ^{ab}	176 ^c	51 ^b
	Tinaroo	122 ^{ab}	182 ^{bc}	58 ^b
	Ravenshoe	131 ^a	187 ^b	53 ^b
	Paluma	126 ^{ab}	204 ^a	74 ^a
	F _{famille(provenance)}	2,37 *	0,50 n.s.	0,79 n.s.
2000	F _{provenance}	11,83 ***	4,23 ***	0,55 n.s.
	Andranokobaka	121 ^c	169 ^b	42
	Atherton	128 ^{bc}	170 ^b	36
	Tinaroo	130 ^{bc}	181 ^{ab}	43
	Ravenshoe	133 ^b	181 ^{ab}	38
	Paluma	147 ^a	181 ^a	43
	F _{famille(provenance)}	3,37 ***	1,26 n.s.	1,46 n.s.
2001	F _{provenance}	19,39 ***	11,73 ***	0,71 n.s.
	Andranokobaka	111 ^d	162 ^c	49
	Atherton	114 ^{cd}	168 ^{bc}	51
	Tinaroo	122 ^{bc}	175 ^b	51
	Ravenshoe	129 ^b	178 ^b	44
	Paluma	142 ^a	205 ^a	57
	F _{famille(provenance)}	1,11 n.s.	0,89 n.s.	0,96 n.s.

(n.s., *, *** : non significatif au seuil de 5%, significatif au seuil de 5, 0,1%)

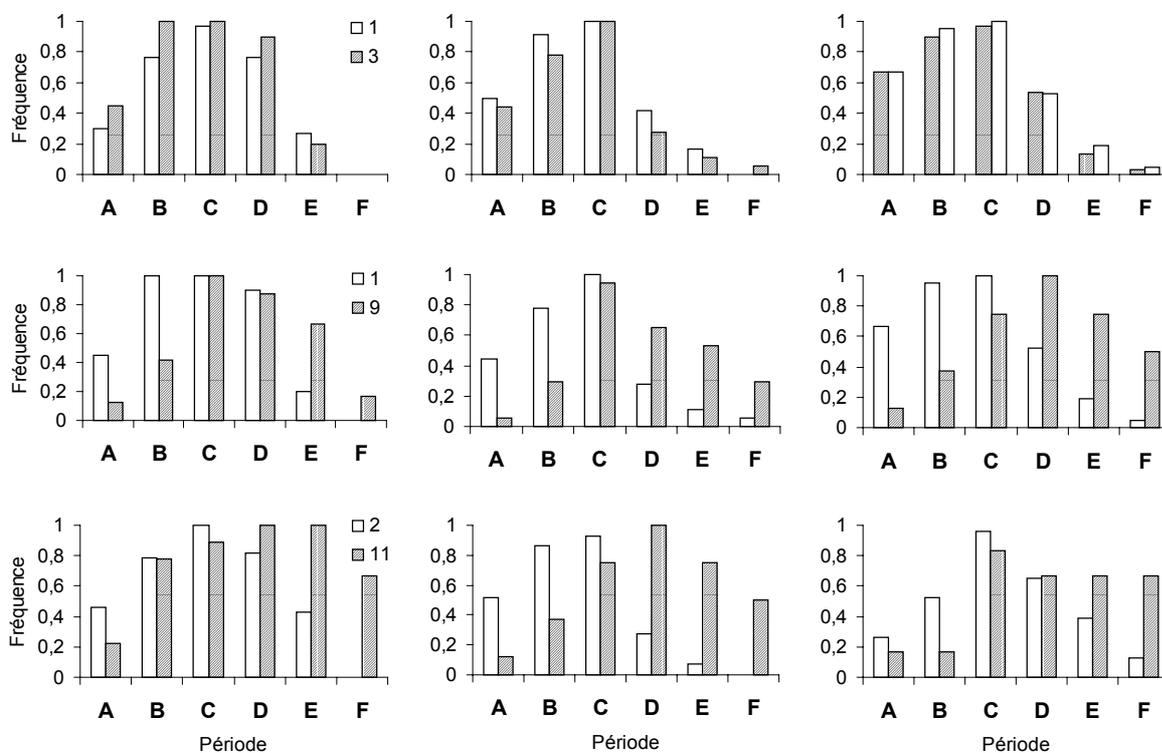


Figure 36. Comparaison annuelle de la dynamique de floraison entre les familles 1 et 3, 1 et 9, 2 et 11

périodes dont les limites correspondent aux taux de floraison de 10, 30 et 60%.

1.4.2 Variabilité intra-spécifique de la floraison

L'analyse de la variance, dont le modèle est décrit dans le paragraphe 5.1.1 du deuxième chapitre, montre que les effets provenances sont hautement significatifs pour la précocité et la tardiveté de la floraison. Les effets familles sont moins marqués mais l'on observe un effet significatif sur la précocité en 1999 et 2000 (tableau 24). Les durées moyennes de floraison par provenance ou par famille ne sont pas significativement différentes. Cependant, nous notons un décalage de floraison allant des plus précoces aux plus tardives dont les extrêmes sont Andranokobaka et Paluma. Par exemple, 50% des arbres de la provenance Andranokobaka sont identifiés comme précoces (en fleur avant le 115^{ème} jour), par contre, pour les provenances de Ravenshoe et de Paluma, 50% et 95% des arbres sont tardifs (en fleur au-delà du 185^{ème} jour). Cette classification au niveau des familles identifie celles fleurissant précocement (1, 2, 3, 4, 5) et celles fleurissant tardivement (6, 7, 10, 9, 11). Dans la troisième partie des résultats, nous verrons les implications de ces résultats sur l'estimation des flux de gènes potentiels.

Le caractère de précocité ou de tardiveté dans la floraison semble acquis. Plusieurs illustrations, au niveau familial, sont données dans la figure 36. Les familles 1 et 3 présentent les proportions similaires d'arbres en fleur sur les 6 phases de la floraison. Par contre, en comparant les mêmes données des familles 1 et 9 ou 2 et 11, le taux est plus élevé pour les familles 1 et 2 en début de saison alors qu'en fin de saison le taux est plus élevé pour les familles 9 et 11. Ces tendances se répètent d'année en année, au moins sur les trois saisons d'observations.

Tableau 25. Liste des espèces d'insectes capturées dans le verger à graines au moyen de filet à papillon et d'un filet passif

Orde	Genre/ espèce	Familles	Filet papillon	Piège passif	Pollinisation
<i>Coleoptera</i>	<i>Mastotontodera basalia</i>	<i>Cerambycidae</i>	2		
	inc	inc		2	
<i>Diptera</i>	<i>Ischiodon aegyptus</i> Wild.	<i>Pipunculidae</i>	1		++
	<i>Megaspisincisa</i>	<i>Pipunculidae</i>	1		++
	<i>Lathyrophthalmus madagascariensis</i>	<i>Syrphidae</i>	1		+++
	<i>Scyrphus pfeifferi</i>	<i>Syrphidae</i>		1	+++
	inc	<i>Syrphidae</i>		1	
	<i>Ceratitis malagassa</i>	<i>Trypetidae</i>	1		++
	<i>Chrysomia albiceps</i>	<i>Calliphoridae</i>		2	+
	<i>Sarcophaga ribialis</i>	<i>Calliphoridae</i>		2	+
	inc	<i>Tipulidae</i>		3	
	inc	inc		12	
<i>Hymenoptera</i>	<i>Apis mellifera unicolore</i>	<i>Apidae</i>	69		+++
	<i>Stilbum viride</i> Guer.	<i>Chrysididae</i>	1		
	<i>Cyphononyx grandidieri</i>	<i>Pompilidae</i>	1		
	<i>Elis</i> sp.	<i>Scolidae</i>	1		
	<i>Spex torridus</i> Smith	<i>Spicidae</i>	1		
	inc	inc		4	
<i>Lepidoptera</i>	<i>Parnara pontieri</i> Boisduval	<i>Hesperidae</i>	1		
	inc	<i>Pieridae</i>	1		
	<i>Eurema brigitta pulchella</i>	<i>Pieridae</i>	1		
	<i>Omphalestra herbuloli</i>	<i>Noctuidae</i>		2	+
	<i>Sclocoris</i> sp.	<i>Pentatomidae</i>		1	
	inc	<i>Cicadellidae</i>		1	
	inc	inc		5	
Totaux	27	15	82	35	-

(inc : inconnu, +, ++, +++ importance croissante pour le rôle des insectes dans la pollinisation)

1.5 IDENTIFICATION DE LA POPULATION DE POLLINISATEURS

La capture au filet à papillon s'effectue directement sur les rameaux fleuris. Ceci a pour conséquence de récolter les insectes présents à ce moment sur les fleurs. Ils sont susceptibles de jouer, comme des abeilles domestiques, un rôle effectif sur la pollinisation. A l'inverse, ce type de récolte s'adresse également aux insectes qui n'ont pas de lien à la pollinisation, si ce n'est qu'il peut s'agir d'insectes prédateurs venant simplement s'alimenter ou nicher. Cette méthode de piégeage n'est effectuée que dans la journée et les insectes pollinisateurs nocturnes sont occultés. Le piège passif a, quant à lui, permis d'échantillonner le nuage d'insectes présents au niveau de la canopée sans faire la distinction entre ceux qui ont un rôle effectif dans la pollinisation et ceux qui n'en ont pas. Mais il a permis de récolter des insectes nocturnes jouant un rôle dans la pollinisation des fleurs.

Les identifications ont été réalisées par une équipe conjointe du Fofifa-Dra (Département Recherche Agronomique) et du PBZT (Parc Botanique et Zoologique de Tananarive) mené par M. Rajaonarison Jocelyn du Fofifa-Dra.

La population d'insectes est constituée de coléoptères, diptères, hyménoptères et lépidoptères renfermant 17 espèces identifiées et 16 familles distinctes (tableau 25). Les méthodes de piégeage ont été différentes et leurs produits varient considérablement. La proportion d'abeilles domestiques recueillie au filet à papillon est très élevée alors qu'elle est nulle au piège passif. Avec ces dernières, les diptères *Lathyrophthalmus madagascariensis*, *Scyrphus pfeifferi* de la famille des *Syrphidae* sont les pollinisateurs potentiels les plus efficaces. Ensuite viennent *Ischiodon aegyptus*, *Megaspisincisa* de la famille des *Pipunculidae* et les *Calliphoridae* : *Chrysomia albiceps* et *Sarcophaga ribialis*. Dans la région, la saison de floraison correspond au début de la période froide avec la présence de crachin journalier et d'une forte humidité matinale. Les observations de terrain montrent que les bourdonnements d'insectes sont perceptibles avec l'apparition du soleil vers 8 heures quand l'humidité diminue. La région est caractérisée par des vents dominants qui se lèvent entre 10 et 12 heures et qui prennent fin entre 16 et 18 heures. La pollinisation des eucalyptus semble s'effectuer essentiellement dans la matinée car la production de nectar n'est effective qu'en début de journée (Hogdson 1976a, Law et al. 2000).

Tableau 26. Variabilité intra-spécifique des capsules d'*E. grandis* - Effets provenance et famille

Effets	1998				1999			
	Longueur capsule	Diamètre capsule	Poids capsule	Nombre capsule/kg	Longueur capsule	Diamètre capsule	Poids capsule	Nombre capsule/kg
F _{provenance}	5,15 ***	3,54 ***	13,5 ***	18,24 ***	4,82 ***	7,66 ***	7,26 ***	2,51 *
Andranokobaka	6,4 a	5,6 a	84 a	12626 c	5,5 a	6,4 a	68 a	15457 c
Atherton	5,8 ab	5,4 a	73 b	13962 bc	5,2 a	5,5 b	60 a	17175 c
Tinaroo	5,0 b	5,4 a	64 bc	15932 b	5,0 ab	4,6 b	50 b	20342 b
Ravenshoe	5,4 b	5,0 ab	53 cd	19714 a	4,7 bc	5,4 b	46 b	23063 a
Paluma	5,1 b	4,6 b	48 d	21098 a	4,5 c	5,3 c	42 b	24152 a
F _{famille(provenance)}	2,04 *	1,53 n.s.	4,09 ***	4,34 ***	1,46 n.s.	0,43 n.s.	2,11 *	14,27 ***
1	6,5 ab	6,0	93 a	12114 d	6,4	5,8	74 a	15071 d
2	6,6 a	5,3	81 ab	12798 d	6,5	5,2	64 ab	15890 cd
3	6,1 abcd	5,4	80 ab	12796 d	6,5	5,5	67 ab	15475 cd
4	6,2 abc	5,5	77 ab	13034 d	5,7	5,2	62 abc	16668 cd
5	5,2 bcd	5,3	67 bcd	15288 bcd	5,2	5,3	56 abc	18018 cd
6	5,0 cd	5,3	53 cd	18870 ab	4,6	5,0	43 c	13108 ab
7	4,7 d	5,4	68 bc	14678 cd	4,5	5,0	53 bc	19390 bcd
8	5,2 bcd	5,5	67 bcd	15041 bcd	4,6	5,1	52 bc	19816 bcd
9	5,6 abcd	5,1	58 cd	18411 abc	5,6	4,8	50 bc	20515 ab
10	5,1 bcd	4,9	47 d	21505 a	5,2	4,6	43 c	25293 a
11	5,1 bcd	4,6	48 d	21098 a	5,3	4,5	42 c	24152 ab

n.s., *, **, *** : non significatif au seuil de 5%, significatif au seuil de 5, 1, 0,1%

Tableau 27. Variabilité intra-spécifique des caractéristiques grainières – Effets provenance et famille

Effets	1998				1999			
	N1	N2	P	N3	N1	N2	P	N3
F _{provenance}	4,55 **	0,48 n.s.	8,12 ***	2,01 n.s.	0,54 n.s.	1,38 n.s.	2,8 *	0,26 n.s.
Andranokobaka	825 b	10,3	11,4 a	137184 b	962	9,7	13,6 a	154280
Atherton	990 b	10,8	8,9 ab	151891 b	998	9,0	10,1 b	158992
Tinaroo	877 b	8,7	10,6 a	140493 b	776	7,9	11,4 ab	162482
Ravenshoe	1104 b	10,6	8,4 ab	198563 b	832	7,5	9,5 b	156777
Paluma	2254 a	13,4	5,6 b	287224 a	1020	5,6	6,7 c	134482
F _{famille(provenance)}	2,34 *	1,35 n.s.	10,13 ***	2,16 *	1,34 n.s.	3,04 **	4,38 ***	3,45 **
1	759 b	10,6	16,2 a	153873 ab	963	10,3 ab	13,2 ab	161753 ab
2	933 b	9,7	11,1 bc	130551 ab	1152	9,6 ab	9,2 abcd	159225 ab
3	784 b	10,6	14,4 ab	131666 ab	801	9,2 ab	12,1 abc	142622 ab
4	943 b	9,2	10,2 cd	120865 ab	973	8,3 ab	9,3 abcd	136440 ab
5	1044 b	12,7	11,0 bcd	188087 ab	1038	10,3 ab	9,4 abcd	196578 ab
6	1572 b	12,9	8,3 cd	240611 ab	1064	13,3 a	14,5 a	296852 a
7	1155 b	9,6	8,4 cd	139926 ab	765	5,6 ab	7,3 bcd	104578 b
8	475 b	6,5	14,2 ab	96185 b	675	7,0 ab	11,1 abcd	139940 ab
9	1029 b	11,5	11,2 bc	205751 ab	1192	11,7 ab	10,3 abcd	63484 b
10	1241 b	9,0	7,2 cd	185385 ab	414	2,7 b	7,1 cd	236742 ab
11	2254 a	13,4	7,0 d	287224 a	1020	5,6 ab	6,2 d	134482 ab

N1= nombre de graines viables par gramme, N2= nombre de graines viables par capsules, P= poids de graines (mg) par capsule, N3= nombre de graines viables par kg de capsules, n.s., *, **, *** : non significatif au seuil de 5%, significatif au seuil de 5, 1, 0,1%

1.6 LA FRUCTIFICATION DU VERGER

Au-delà de la quantité de fleurs produites et de sa variabilité dans la population parentale, la capacité semencière d'un individu dépend principalement de l'efficacité de la fécondation, de la taille des fruits (diamètre, longueur et poids) obtenus ainsi que de leur taux de remplissage (graines viables). Ces caractéristiques seront analysées en fonction de la structuration de la population, du type de pollinisation, de l'année de floraison.

Nous considérerons séparément les fruits de l'année 1999 ayant une maturité de 5-6 mois et ceux de l'année 1998 pour lesquels la maturité est de 17-18 mois. Les récoltes, habituellement menées dans les vergers, ne tiennent pas compte de cette distinction. Néanmoins, un verger exploité annuellement ne produit que le premier type de fruit. Les résultats présentés ici sont en partie tirés des travaux de Ramanantoandro (2000).

1.6.1 Variabilité intra-spécifique des caractéristiques de la fructification

La taille des capsules dépend significativement de l'origine des arbres. Les résultats permettent de distinguer, sur la quasi-totalité des caractères, les provenances d'Andranokobaka et d'Atherton par rapport à celles de Tinaroo, Ravenshoe et Paluma (tableau 26). Le nombre de fruits par kilogramme varie de 12626 pour les capsules produites par les semenciers originaires d'Andranokobaka à plus de 21000 pour l'échantillon de Paluma. Globalement, les effets familles sont moins élevés mais ils sont significatifs sur les caractéristiques liées au poids des capsules. L'écart maximal entre les valeurs moyennes familiales va du simple au double.

Que ce soit sur les fruits de 1998 ou de 1999, les effets provenances et familles sont moins importants sur les caractéristiques grainières (tableau 27). Au niveau des provenances, les effets sont significatifs pour le poids de graines par capsules. Ce caractère est en fait corrélé positivement avec le poids et la taille des capsules. Les différences observées sur l'échantillon de 1998 sont essentiellement dues aux résultats obtenus pour la provenance Paluma, qui ne se renouvellent pas en 1999. Nous mettons en évidence des effets familles significatifs sur la plupart des caractéristiques. Ceci traduisant une variabilité intra-spécifique élevée. En moyenne familiale en 1999, le nombre de graines viables par capsules varie de 2,7 à 13,3 et la quantité de graines viables par kilogramme de capsules passe de 63484 à 296852.

Tableau 28. Comparaison des caractéristiques grainières selon le type de croisement

Type de croisement	Poids capsule	Poids de graines par capsule	Nombre de graines par capsule	Nombre de graines par gramme	Nombre de graines par kg de capsules	Nombre de capsules par kg
Libre	0,068 ^a	0,011 ^a	10,6 ^a	1000 ^a	177201 ^b	16550 ^b
Allofécondation	0,057 ^a	0,010 ^a	14,3 ^b	1242 ^a	283696 ^a	22576 ^a
Autofécondation	0,045 ^b	0,008 ^b	4,0 ^c	339 ^b	101410 ^b	25475 ^a
CV	34	35	51	65	60	48
F _{type de croisement}	8,64	3,49	10,78	8,85	6,42	9,85
Probabilité	0,0003	0,0337	0,0001	0,0004	0,0026	0,0001

Graines = graines viables, CV : coefficient de variation

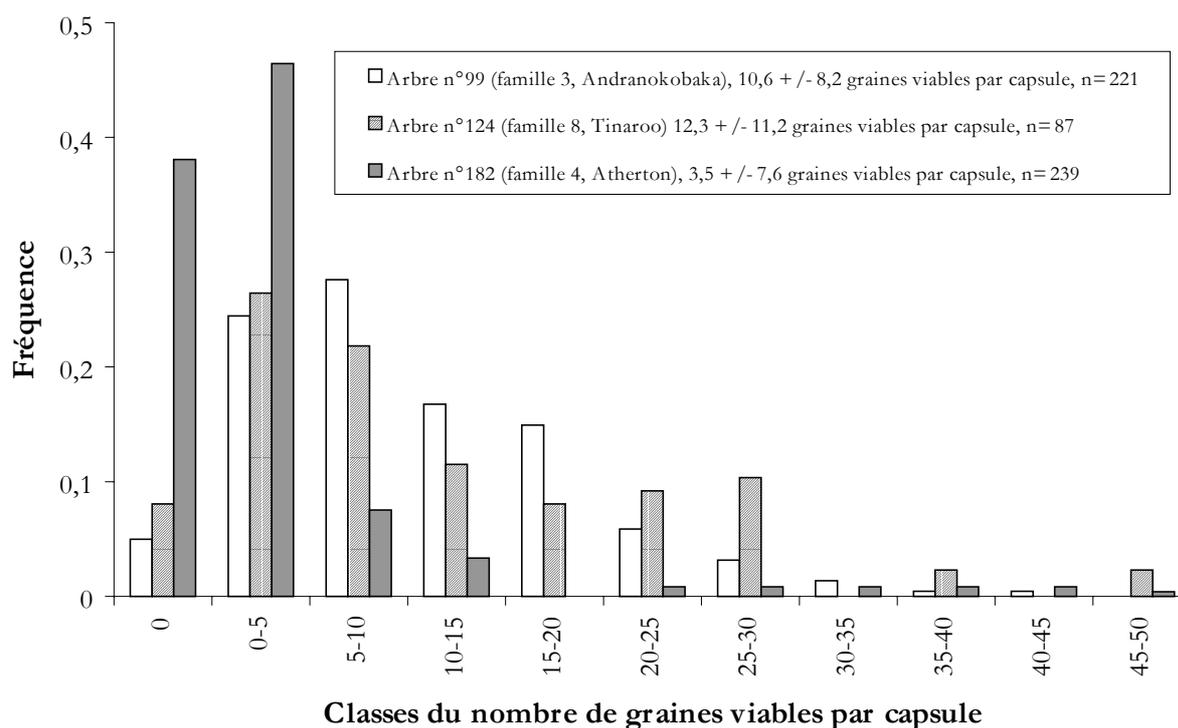


Figure 37. Variabilité du nombre de graines viables par capsules sur un échantillon de 3 arbres-mères

Tableau 29. Comparaison des caractéristiques moyennes des capsules de 1998 et 1999

Caractéristiques	Unité	1998	1999	F	P
Poids capsule	mg	70 ± 19 ^a	57 ± 17 ^b	23,5	> 0,0001
Diamètre capsule	mm	5,3 ± 0,5 ^a	5,1 ± 0,5 ^a	3,3	0,069
Hauteur capsule	mm	5,7 ± 0,8 ^a	5,6 ± 0,9 ^a	0,7	0,410
Poids de graines viables/ capsule	mg	11,3 ± 4,1 ^a	9,8 ± 5,2 ^b	6,5	0,012
Graines viables / capsule	nombre	10,4 ± 5,9 ^a	8,6 ± 5,7 ^b	4,3	0,039
Graines viables / gramme	nombre	1015 ± 748 ^a	923 ± 581 ^b	0,9	0,340
Graines viables / kg capsule	nombre	162623 ± 114321 ^a	155555 ± 113895 ^a	0,2	0,672
Capsule / kg	nombre	15403 ± 4307 ^a	18628 ± 4806 ^b	24,7	0,0001

1.6.2 Caractéristiques grainières en fonction du type de pollinisation

Les résultats, présentés ici, concernent la comparaison entre la pollinisation libre et les croisements contrôlés en autofécondation ou en allofécondation. Pour ces deux derniers cas, nous supposons que le pollen n'est pas limitant et que nous obtenons, dans chacun des cas, les valeurs maximales de remplissage des capsules. L'échantillon est constitué de 10 arbres provenant de la plupart des provenances du verger. Les capsules et les graines ont été traitées de la même façon que précédemment.

Sur la plupart des caractéristiques étudiées, l'effet du type de fécondation est significatif (tableau 28). Les valeurs sont nettement plus faibles en autofécondation. Les fruits sont plus petits mais les résultats ne montrent pas de différence sur le contenu (en poids) des capsules. En allofécondation, le taux de remplissage en graines viables est plus important de 50 et de 300% par rapport à ceux obtenus, respectivement, en pollinisation libre et en autofécondation. Globalement, nous constatons que les résultats en pollinisation libre sont intermédiaires.

La variabilité du nombre de graines viables par capsule en pollinisation libre est importante (figure 37). Si en moyenne nous avons observé 10 graines viables par capsule, correspondant à une gamme de l'ordre de 5 et 25 graines par capsule, une part de celles-ci renferment jusqu'à 50 graines viables.

1.6.3 Caractéristiques grainières en fonction de l'année de production

Les caractéristiques annuelles et générales sont présentées dans le tableau 29. Les fruits de 1998 ont une longueur de 5,3 (4-8) mm pour un diamètre de 5,7 (4-7) mm. Le poids individuel des capsules est très variable. Il est compris entre 35 et 152 mg avec une moyenne de 70mg. Pour les fruits de 1999, ces chiffres sont respectivement : 5,1 (4-7,5) mm, 5,1 (4-9) mm, 57 (27-48) mg. Nous ne mettons pas en évidence de différences significatives sur la taille des capsules liées à leur maturité. En revanche, le poids des fruits de l'année 1998 est significativement plus important, lié probablement au niveau de lignification.

Le nombre moyen de graines viables par capsule est de 10,4 pour les fruits de l'année 1998 et de 8,6 pour 1999 avec des gammes respectives de 6,5-13,4 et de 2,7-13,3. Le nombre de graines viables par gramme du mélange, constitué par les graines viables, les ovules non fertilisées et les débris divers, est de 1015 et 923. Comme le nombre de graines viables par capsule, le poids du contenu des capsules est significativement plus élevé pour les fruits de 1998. Mais en définitive, le nombre de graines viables par kilogramme de capsules ne diffère pas d'une année sur l'autre.

1.7 CONCLUSIONS SUR LES CARACTERISTIQUES GENERALES DES GENITEURS

Avec des outils récemment développés et adaptés aux marqueurs microsatellites, nous avons pu retrouver l'identité des arbres de bordure. En dehors des 8 arbres pour lesquels nous n'avons pas identifié l'origine, les informations sur la population parentale sont complètes. A partir des données alléliques, nous avons montré que la variabilité intra-population représente l'essentiel de la diversité génétique de la population parentale. Après l'éclaircie sélective, la densité à l'intérieur du verger varie de façon importante. Cette éclaircie a eu pour effet d'homogénéiser les phénotypes mais a conduit à une représentation déséquilibrée des familles et à une hétérogénéité dans l'occupation spatiale du terrain. Toutefois, la diversité allélique de la population est encore importante.

La variabilité intra-spécifique des caractères de croissance, y compris la taille du houppier, s'explique par des effets provenances et des effets familles significatifs. Les provenances, originaires du nord de l'aire naturelle (Andranokobaka et Atherton), présentent un développement général plus important. La variabilité des caractères de croissance et la compétition entre voisins contribuent à la constitution de groupes d'arbres dominants, codominants et dominés suggérant potentiellement l'existence de croisements préférentiels.

Dans les conditions écologiques de notre étude, *E. grandis* fleurit avant 10 ans. Le taux moyen annuel de floraison du verger atteint près de 85%. Trois arbres seulement n'ont jamais fleuri durant les trois années d'observations. Les cycles de floraison sont réguliers et semblent acquis que ce soit au niveau du verger ou des provenances, indiquant la bonne adaptation biologique de l'espèce et le bon choix des provenances par rapport aux conditions écologiques du site d'étude. En dehors du pic de floraison relativement stable d'une année sur l'autre, nous avons mis en évidence l'existence de familles ou de provenances précoces et tardives, entraînant potentiellement des croisements préférentiels selon la période de floraison. Les provenances issues du nord de l'aire naturelle sont plus précoces.

Le piégeage et l'identification des insectes présents dans le verger au moment de la floraison ont montré une proportion élevée d'abeille domestique (*Apis mellifera*) et la présence de diptères pollinisateurs.

Nous avons mis en évidence la variabilité intra-spécifique des caractéristiques grainières en distinguant les provenances d'Andranokobaka et d'Atherton sur l'échantillon d'arbres étudiés. Les conditions environnementales du verger sont favorables à une production grainière régulière. Elles conduisent à un taux de remplissage des capsules efficace mais très variable. Enfin nous avons vu que le rapport entre le nombre de graines viables et le poids des capsules était peu variable quelle que soit l'année de production des fruits qui, pourtant, présentaient des caractéristiques différentes. En conséquence, l'équilibre des contributions maternelles dans la variété peut se mesurer par une simple pesée des capsules pour les différents lots de graines pour estimer le nombre de plants correspondant.

En autofécondation, la qualité de la fructification est affectée probablement par l'action combinée des mécanismes d'auto-incompatibilité partielle et des effets de la dépression consanguine. Toutefois, le taux de remplissage en pollinisation libre des capsules, comparé à ceux obtenus en autofécondation et en allofécondation strictes, indique un mode de reproduction dans le verger préférentiellement allogame. Les croisements en allofécondation ont montré un accroissement significatif du taux de remplissage des capsules. En conséquence, le taux de remplissage des fruits dépend du porte-graines et probablement de nombreux facteurs liés, en partie, à l'efficacité pollinisatrice des insectes à travers la quantité de pollen déposée sur le stigmate et son origine.

2. ESTIMATION DES FLUX DE GENES DANS LE VERGER

L'objectif des vergers à graines est de maximiser le progrès génétique tout en conservant une diversité génétique suffisante. Pour optimiser la production d'un verger à graines, nous cherchons à réunir les conditions favorables pour :

- minimiser les flux de pollen extérieurs au verger ;
- maximiser le nombre de géniteurs qui participent à la constitution de la génération suivante ;
- équilibrer la participation des géniteurs ;
- minimiser le taux de croisement entre individus apparentés et réduire l'autofécondation.

Dans cet objectif, nous aborderons l'étude des flux de gènes par deux approches. Les contributions des provenances et des familles au nuage pollinique varient en fonction du nombre d'arbres qui les représentent. Elles dépendent, aussi, de la durée moyenne de floraison des génotypes et de la période dans l'année. Nous tenterons d'identifier les contributions de chacun à partir de leur phénologie. D'autre part, nous effectuerons des analyses de paternité aux moyens de marqueurs microsatellites sur un sous-ensemble du verger. Au final, nous devrions être en mesure d'apporter les éléments de réflexion pour la gestion des populations d'amélioration dans le schéma de sélection développé à Madagascar.

2.1 ESTIMATION DES FLUX DE GENES POTENTIELS

2.1.1 Analyses des observations effectuées

Nous faisons, a priori, l'hypothèse que les contributions individuelles au pool de gamètes mâles et au pool de gamètes femelles sont identiques et que cette contribution est estimée par la durée de la floraison en terme d'arbre-jour (A/J) en floraison que ce soit au niveau provenance ou famille. Nous reprendrons ici le découpage de la saison de floraison (deuxième chapitre, paragraphe 1.4.1). Nous ne considérerons que les arbres du plateau central pour lesquels nous avons effectué les relevés. Soit :

La durée de floraison, en jour, de l'arbre i de la provenance (ou de la famille) j pendant la période k : D_{ijk}

Le nombre d'A/J en floraison de la provenance (ou de la famille) j pendant la période k : $\sum_i D_{ijk}$

Le nombre d'A/J en floraison du verger pendant la période k : $\sum_j \sum_i D_{ijk}$

La contribution relative dans le nuage pollinique ou dans la population d'ovules de la provenance (ou de la famille) pendant la période k ($\sum_j P_{jk} = 1$) : $P_{jk} = \sum_i D_{ijk} / \sum_j \sum_i D_{ijk}$

En faisant l'hypothèse qu'il n'existe pas de croisements préférentiels et donc que les croisements intra- ou inter-provenances (ou familles) sont équilibrés, la probabilité de croisement entre deux individus est donnée par :

La probabilité de croisement intra-provenance (ou intra-famille) : $C_{jjk} = P_{jk}^2$

La probabilité de croisement inter-provenance (ou inter-famille) : $C_{jj'k} = 2P_{jk} \times P_{j'k}$

avec $\sum C_{jjk} + \sum C_{jj'k} = 1$

Les probabilités de croisement entre deux provenances (ou deux familles), sur l'ensemble de l'année, sont calculées en additionnant les résultats obtenus pour chaque période et en les pondérant par leur importance relative. Nous faisons l'hypothèse que les croisements sont inexistant entre deux périodes (ce qui peut être faux à la limite entre deux périodes) et que les probabilités ne varient pas durant une période. Nous pourrions également travailler jour par jour, mais les observations ne sont pas quotidiennes et l'hypothèse que les croisements entre deux jours sont inexistant est nettement moins robuste. Soit :

Le nombre d'arbres de la provenance (ou de la famille) j en fleurs pendant la période k : N_{jk}

Le nombre total d'arbres en fleurs pendant la période k : $\sum_j N_{jk}$

La représentation de la provenance (ou de la famille) j pendant la période k : $N_{jk} / \sum_j N_{jk}$

Occurrence des croisements :

Intra-provenance (ou intra-famille) pendant la période k : $C_{jjk} = (N_{jk} / \sum_j N_{jk})^2$

Inter-provenance (ou inter-famille) : $C_{jj'k} = 2(N_{jk} / \sum_j N_{jk})(N_{j'k} / \sum_j N_{j'k})$

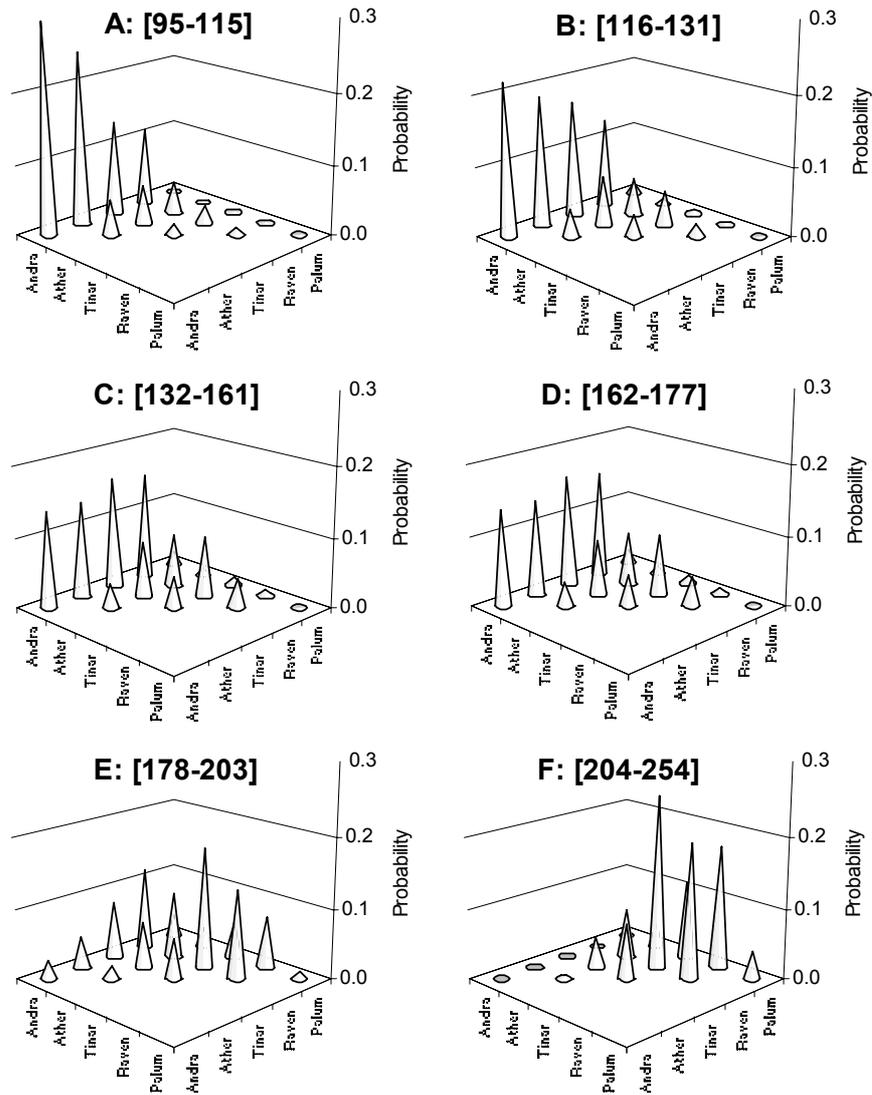


Figure 38. Evolution du nuage pollinique durant la floraison - contributions potentielles des provenances

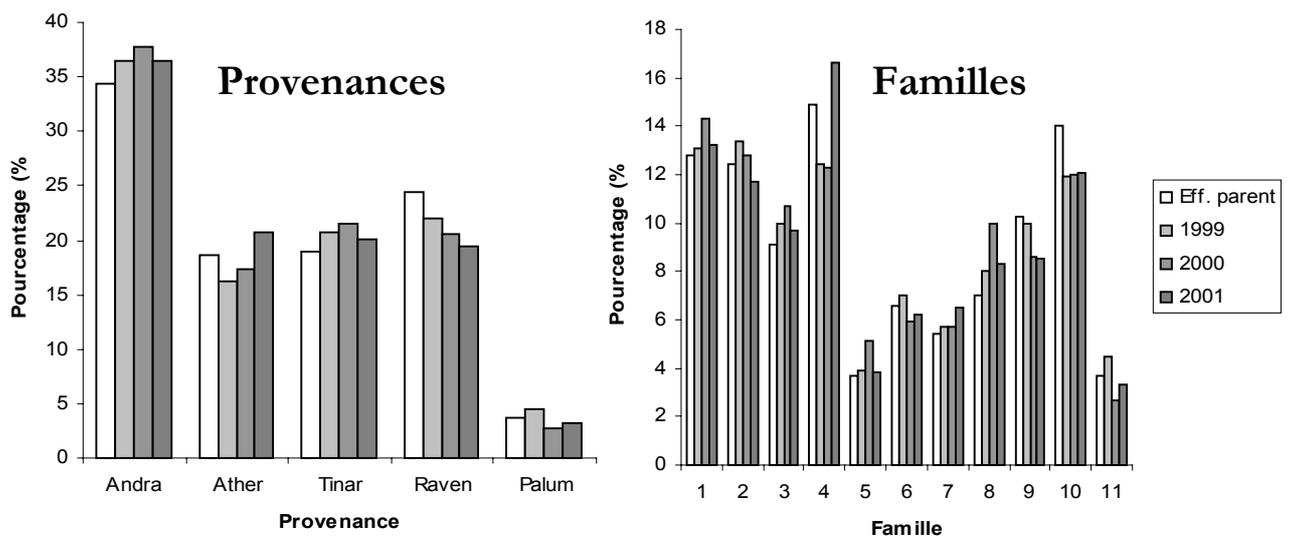


Figure 39. Contributions potentielles annuelles, dans le nuage pollinique, des provenances et des familles et comparaison avec leurs effectifs respectifs dans le verger à graines

Le poids de la période k dans la saison : $\sum_j N_{jk} / \sum_j \sum_k N_{jk}$

La représentation de la provenance (ou de la famille) j dans le lot de graines récoltées en fin de saison est donnée par :

$$C_{jj} + C_{jj'} = \sum_k \left(\left(\sum_j N_{jk} / \sum_j \sum_k N_{jk} \right) \times C_{jjk} \right) + \sum_k \left(\left(\sum_j N_{jk} / \sum_j \sum_k N_{jk} \right) \times C_{jj'k} \right)$$

2.1.2 Flux de gènes potentiels dans le verger à graines

Les probabilités de croisement, à l'intérieur du verger, que ce soit entre arbres de telle ou telle provenance (ou famille) expriment l'évolution du nuage pollinique au cours des six périodes prédéterminées de la floraison. En début de saison, périodes A et B, les croisements les plus probables concernent la provenance d'Andranokobaka en croisements intra et en croisement inter, par ordre décroissant, avec les provenances d'Atherton, Ravenshoe et de Tinaroo, mais les probabilités de croisement entre les arbres de ces dernières restent faibles (figure 38). Nous observons des contributions plus équilibrées durant les périodes C et D. En fin de floraison, périodes E et F, les provenances de Ravenshoe et de Paluma dans un premier temps et avec celle de Tinaroo ensuite contribuent, potentiellement, de façon plus importante au nuage pollinique. En d'autres termes, selon la période de floraison, nous observons, ici, plusieurs groupes de croisements préférentiels potentiels. Ceci pouvant avoir un impact selon que l'on effectue des récoltes de graines sur des arbres fleurissant précocement ou tardivement.

Les contributions, sur une saison de floraison, que ce soit des provenances ou des familles, ne diffèrent pas de leur effectif dans le verger (figure 39). En considérant les données, pour les trois saisons de floraison, les contributions potentielles des différents génotypes sont équivalentes à leurs fréquences dans le verger en terme d'effectif à savoir : 35% pour la provenance d'Andranokobaka ; 20% pour les provenances d'Atherton, de Tinaroo et de Ravenshoe ; 5% pour la provenance de Paluma. Ceci peut s'expliquer par le simple fait que les durées de floraison ne diffèrent pas significativement, ce qui revient à dire que les groupes de génotypes contribuent de façon proportionnelle au nombre d'individus les constituant.

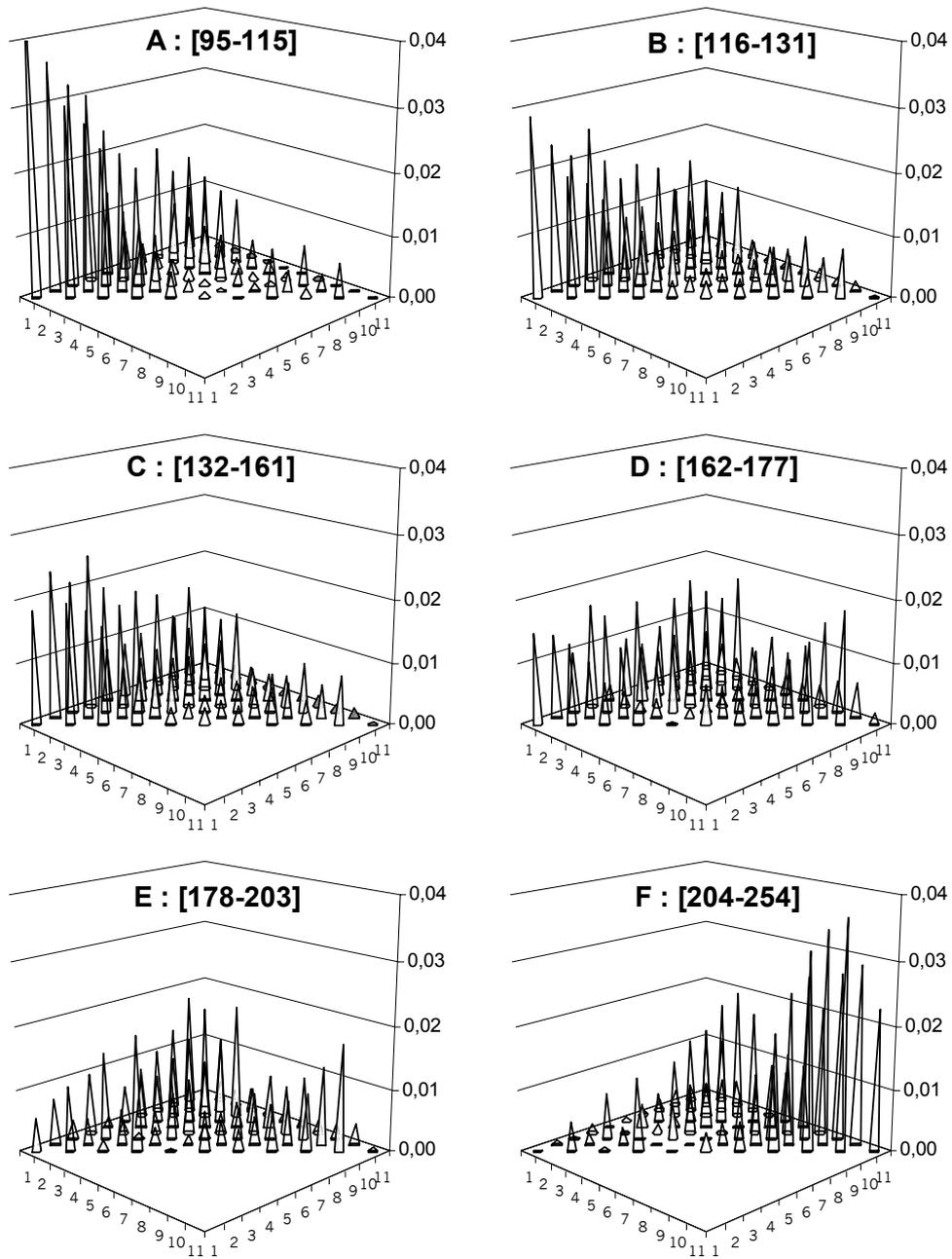


Figure 40. Evolution du nuage pollinique durant la floraison - contributions potentielles des familles

Les résultats au niveau des familles, nous amènent aux mêmes conclusions, à savoir qu'il existe des croisements préférentiels potentiels en début et en fin de saison de floraison et qu'ils correspondent aux observations effectuées au niveau des provenances. Notons que, durant la période intermédiaire, C et D, la contribution des familles est mieux équilibrée avec, néanmoins, une contribution plus élevée des familles originaires d'Andranokobaka et d'Atherton (figure 40).

Tableau 30. Probabilité d'exclusion (EP) et probabilité d'identité (IP) pour les six loci microsatellites de la population parentale

Locus	EP	IP
Embra06	0,698	0,039586
Embra10	0,738	0,029648
Embra11	0,519	0,106655
Embra13	0,424	0,167533
Embra15	0,761	0,024531
Embra19	0,435	0,152592
Tous les loci	0,99703	0,000132

Tableau 31. Résultats de l'analyse de paternité des 30 descendance étudiées

Arbre-mère	Famille maternelle	Précoce /tardif	N	N ₁	N ₁ /N (%)	N ₂	t (%)	N _e	N _o	N _e /N _o
1	1	-	20	13	65,0	2	90,0	11,3	12	0,94
4	10	-	23	7	30,4	1	95,7	7,0	7	1,00
10	1	-	20	13	65,0	0	100,0	8,9	10	0,89
12	3	Tardif	11	6	54,5	0	100,0	6,0	6	1,00
24	8	Précoce	18	13	72,2	0	100,0	13,0	13	1,00
26	1	Précoce	19	12	63,2	0	100,0	10,3	11	0,94
39	2	Précoce	20	13	65,0	0	100,0	11,3	12	0,94
52	9	-	19	14	73,7	1	94,7	12,2	13	0,94
68	4	-	20	11	55,0	0	100,0	9,3	10	0,93
76	8	-	50	26	52,0	0	100,0	22,5	24	0,94
86	2	-	20	9	45,0	0	100,0	7,4	8	0,93
93	4	-	20	9	45,0	0	100,0	5,4	7	0,77
107	2	-	48	23	47,9	1	97,9	19,6	21	0,93
115	4	-	22	16	72,7	2	90,9	4,9	8	0,61
124	8	Tardif	18	15	83,3	0	100,0	10,7	12	0,89
125	1	Précoce	18	8	44,4	0	100,0	8,0	8	1,00
136	7	-	60	39	65,0	1	98,3	25,8	31	0,83
142	9	Tardif	19	9	47,4	0	100,0	7,4	8	0,93
146	4	Tardif	20	13	65,0	0	100,0	8,9	10	0,89
148	8	Précoce	19	14	73,7	0	100,0	14,0	14	1,00
154	3	-	20	14	70,0	0	100,0	12,2	13	0,94
174	3	Précoce	19	10	52,6	0	100,0	10,0	10	1,00
182	4	Tardif	22	15	68,2	0	100,0	11,8	13	0,91
195	1	Précoce	60	41	68,3	1	98,3	12,6	21	0,57
261	1	-	19	12	63,2	0	100,0	12,0	12	1,00
202	2	-	20	13	65,0	1	95,0	6,8	10	0,68
209	3	Précoce	19	14	73,7	5	73,7	5,2	8	0,65
213	2	-	19	14	73,7	2	89,5	10,6	12	0,88
225	4	-	20	12	60,0	1	95,0	12,0	12	1,00
239	3	-	22	12	54,5	6	72,7	3,4	7	0,49
Total	-	-	724	440	-	24	-	126,2	199	
Moyenne	-	-	-	-	60,8	-	96,7			0,63

(Précoce/tardif : les arbres précoces fleurissent avant le 115^{ème} jour de l'année et les arbres tardifs fleurissent au-delà du 185^{ème} jour, N : nombre de descendants analysés, N₁ : nombre de descendants avec filiation paternelle interne, N₂ : nombre de descendants issus d'autofécondation, t : taux d'allofécondation, N_o, N_e : nombre de mâles observés et efficaces)

2.2 ESTIMATION DES FLUX DE GENES REELS

Par rapport à ce que nous venons de présenter, nous abordons, ici, l'analyse de paternité dans la descendance d'un sous-ensemble d'arbre-mères du verger à graines. L'approche consiste à déterminer les flux de pollens réels sur une année de floraison (1997).

2.2.1 Paramètres de l'analyse de paternité

La probabilité d'exclusion est conditionnée par le génotype des géniteurs, le nombre de loci indépendants, la distribution et les fréquences alléliques pour chaque locus. Nous avons déjà indiqué que nous pouvions considérer tous les loci indépendants. Le locus Embra15, par exemple, présente la distribution la plus favorable pour une probabilité d'exclusion élevée (tableau 30). Dans la population de géniteurs, les probabilités d'exclusion d'Embra15, d'Embra10, d'Embra06, d'Embra11, d'Embra19 et d'Embra13 sont classées par ordre décroissant. Pour les six loci, la probabilité d'exclusion est de 0,99703 indiquant l'efficacité de l'analyse de paternité. La probabilité d'identité, qui représente la probabilité de trouver deux individus identiques, est de 0,000132 soit environ 1 évènement sur 7500.

Le « cryptic gene flow » ou flux de gènes cryptique est calculé également à partir de simulations. Du fait des paternités externes, le nombre exact de pères réels n'est pas connu. Il dépend du nombre de pères potentiels que l'on s'est fixé. Nous avons effectué plusieurs simulations en faisant varier ce nombre. Nous avons obtenu des valeurs se situant entre 10 et 15%.

2.2.2 Détermination et contributions de la population paternelle

Les analyses de paternité ont été effectuées pour 30 descendances récoltées dans le verger en 1997. Les résultats sont présentés dans le tableau 31. Sur les 724 individus, nous avons attribué une paternité interne au verger à 440. Pour une douzaine d'individus, l'analyse proposait plus d'un père équiprobable, il n'a donc pas été possible de les intégrer. Pour les 284 descendants restants, dont nous n'avons pas été en mesure d'établir une filiation paternelle, nous supposons une origine paternelle externe au verger à graines. Sur cette base, le taux de contamination pollinique s'élève, en moyenne, à 39% pour l'échantillon étudié. Ce taux varie de 17 à 70% selon les arbres mères.



Figure 41. Succès reproducteur et contributions paternelles (nombre total de pères = 199, la hauteur des barres correspond au nombre de pères identifiés 1 à 12 fois dans la descendance)

Tableau 32. Comparaison de la part des provenances et des familles entre la population parentale et la population de mâles identifiés

Provenance	Niveau Provenance	Famille	Niveau famille
Andranokobaka	1,13 (1,19)	1	1,08 (0,88)
		2	1,09 (1,23)
		3	1,29 (1,63)
Atherton	0,85 (0,89)	4	0,92 (1,01)
		5	0,63 (0,50)
Tinaroo	1,17 (1,13)	6	1,30 (1,67)
		7	1,07 (0,67)
		8	1,13 (0,97)
Ravenshoe	0,62 (0,44)	9	0,77 (0,54)
Paluma	1,04 (1,02)	10	0,52 (0,38)
		11	1,04 (1,02)
Arbres de bordure	0,90 (0,90)	-	-

Cette comparaison est basée sur le rapport entre la fréquence pour telle famille ou telle provenance dans la population de mâles identifiés et leurs fréquences dans la population parentale, entre parenthèse on raisonne en terme de descendant

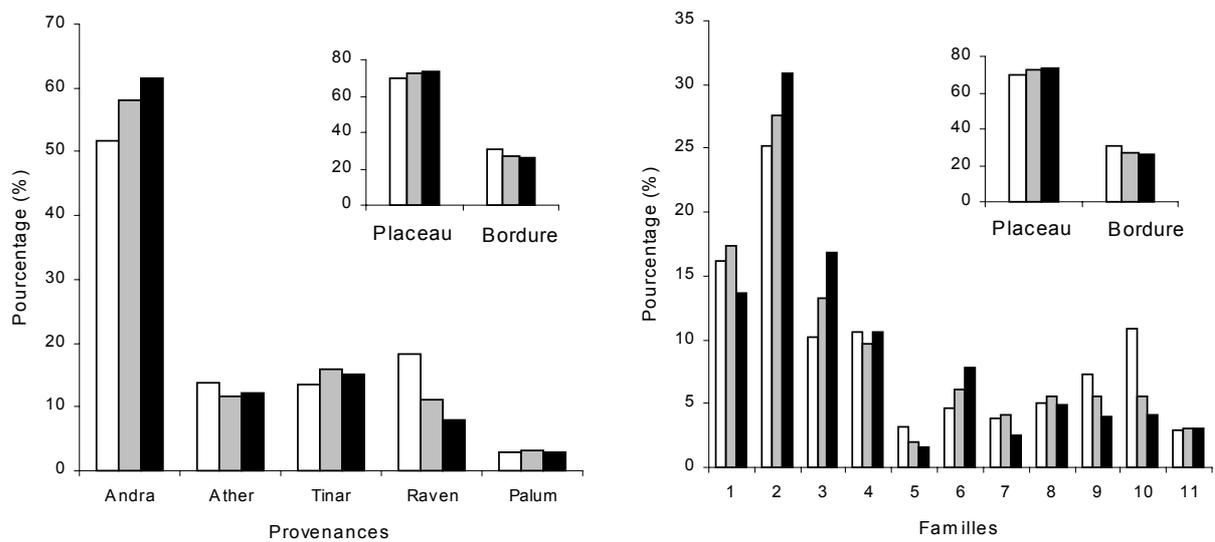


Figure 42. Comparaison entre le nombre de mâles potentiels par provenance ou par famille (barres blanches) et observés (barres grises en terme de mâles et barres noires en terme de descendants, en incrustation, les graphes comparent les mêmes contributions entre les géniteurs du placeau central et ceux de la bordure)

Le nuage pollinique identifié et produit par le verger est constitué par 199 donneurs différents, ce qui représente 56% de la population. Les 440 descendants dont le père a été identifié correspondent à 362 croisements entre 30 arbre-mères et les 199 donneurs de pollen, autofécondations incluses. Le nombre de plein-frères dans une descendance est très faible, il est compris entre 1 et 5. Le succès reproducteur des pères, en terme de nombre de descendants produits, est compris entre 1 et 12 toutes descendance confondues. La figure 41 illustre ces résultats et montre que 50% des arbres ne contribuent qu'une fois dans la constitution de la génération suivante.

Le rapport N_e/N_o (N_e : le nombre de pères efficaces, N_o : le nombre de pères observés) traduit les contributions relatives paternelles au nuage pollinique d'un arbre-mère donné. N_o est obtenu directement des pères observés pour un arbre-mère donné. N_e est calculé pour chaque mère de la façon suivante :

$$N_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^{N_o} f_i^2} \quad \text{où } f_i \text{ est la fréquence du mâle } j \text{ dans le nuage pollinique de l'arbre-mère donné.}$$

Quand les mâles contribuent de façon équivalente $N_e=N_o$, sinon N_e est inférieur à N_o . Plus le rapport N_e/N_o est proche de 1 et moins le nombre de descendants par père est élevé.

En prenant individuellement les arbres-mères, ce rapport est compris entre 0,49 et 1 mais sur l'ensemble, 19 arbres-mères ont un rapport supérieur à 0,90. En prenant la population totale d'arbre-mères, le taux est de 0,63 (tableau 31).

La distribution des géniteurs effectifs dans le nuage pollinique et celle des géniteurs potentiels de la population parentale ne sont pas identiques (tableau 32 et figure 42). Ainsi, nous observons des déviations entre l'importance, en terme d'individu, des familles et des provenances dans le verger et celle observée dans le nuage pollinique. La provenance d'Andranokobaka, qui représente 50% des arbres du verger, contribue pour 61% à la descendance. A l'inverse, la provenance Ravenshoe qui constitue 18% du verger ne contribue qu'à 8%. Les familles 2 et 3 d'Andranokobaka et la famille 10 de Ravenshoe, contribuent le plus fortement à ce biais. La contribution des arbres de bordure et leur part dans la population parentale sont équivalentes (figure 42).

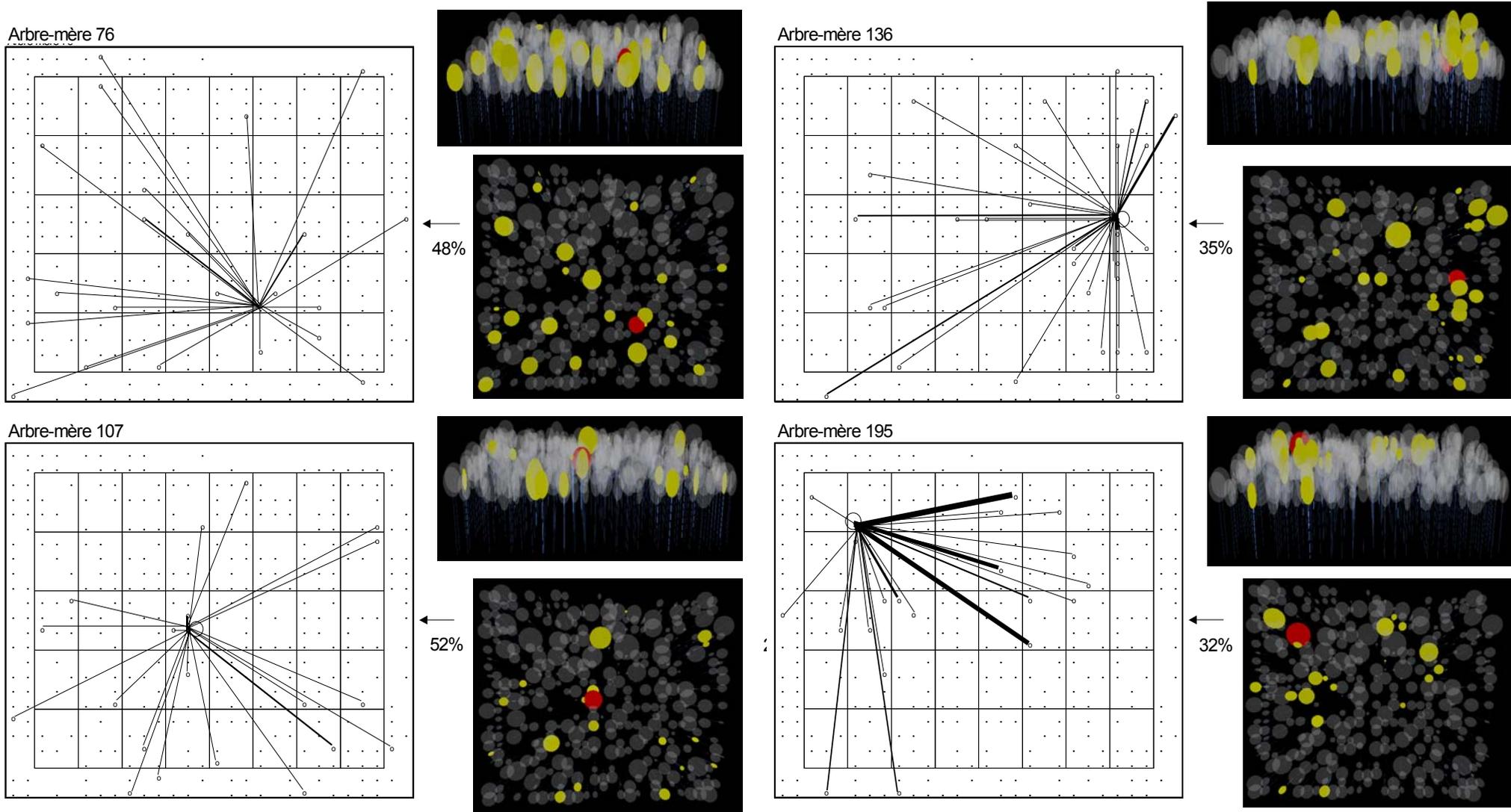


Figure 43. Représentations des contributions polliniques pour 4 arbre-mères (pour chacun sont représentées la carte de dispersion pollinique - l'épaisseur des traits est proportionnelle au nombre de descendants observés - et deux vues du verger avec en rouge l'arbre-mère et en jaune les géniteurs mâles identifiés)

Pour l'échantillon étudié, le taux moyen d'autofécondation dans le verger à graines est de 3,3%. Ceci correspond à 24 individus parmi les 440 descendants. Le taux d'autofécondation est nul pour 18 arbre-mères. Il atteint au maximum 27,3%. Nous n'observons aucune relation évidente entre la position de l'arbre dans le verger et le taux d'autofécondation observé. Le nombre d'individus issus de croisement entre demi-frères est plus élevé puisqu'il concerne 38 individus sur les 440 descendants. Au total, nous avons montré que 14% des descendants sont issus de croisements consanguins à des degrés divers.

2.2.3 Cartes de dispersion pollinique et distances de pollinisation

Les cartes de dispersion pollinique, pour les trente arbres étudiés, sont présentées en annexe 7. La figure 43 présente les résultats observés sur les quatre arbre-mères dont le nombre de descendants est compris entre 48 et 60 descendants et qui sont représentatifs de l'ensemble. Dans les cartes de dispersions polliniques, les différents croisements identifiés par l'analyse de paternité sont indiqués par un trait. Son épaisseur est proportionnelle au nombre de descendants ayant la même filiation paternelle. L'existence de descendants issus d'autofécondation est indiquée par des boucles dont la largeur correspond au nombre de descendants observés. La flèche venant de l'extérieur et le pourcentage indique le flux de pollen externe au verger observé pour chaque géniteur. Les autres représentations, réalisées avec le logiciel Capsis (de Coligny, comm. pers.), présentent la répartition des arbres-pères identifiés, la hauteur et le développement des houppiers.

A première vue, les flux de pollen ne présentent pas de particularité que ce soit au niveau des distances de pollinisation ou de la distribution des pères au sein du verger. Les vents dominants caractéristiques de la région n'ont visiblement aucune influence sur le déplacement des insectes, nous n'observons pas de direction préférentielle de pollinisation. La distance moyenne de pollinisation, calculée sur notre échantillon, est de 32 mètres et les valeurs maximales correspondent aux dimensions maximales du verger. Les distances maximales de pollinisation sont liées à la taille du verger car le pollen provenant de l'extérieur a été transporté sur des distances plus importantes.

Nous avons étudié, à l'intérieur du verger, l'effet de la distance sur la pollinisation pour l'ensemble de l'échantillon et plus précisément pour les quatre arbre-mères précédemment présentés. Il s'agit de comparer les effectifs d'arbre-pères potentiels et efficaces en fonction de la distance qui les sépare des arbre-mères. Les distances de pollinisation potentielles varient en

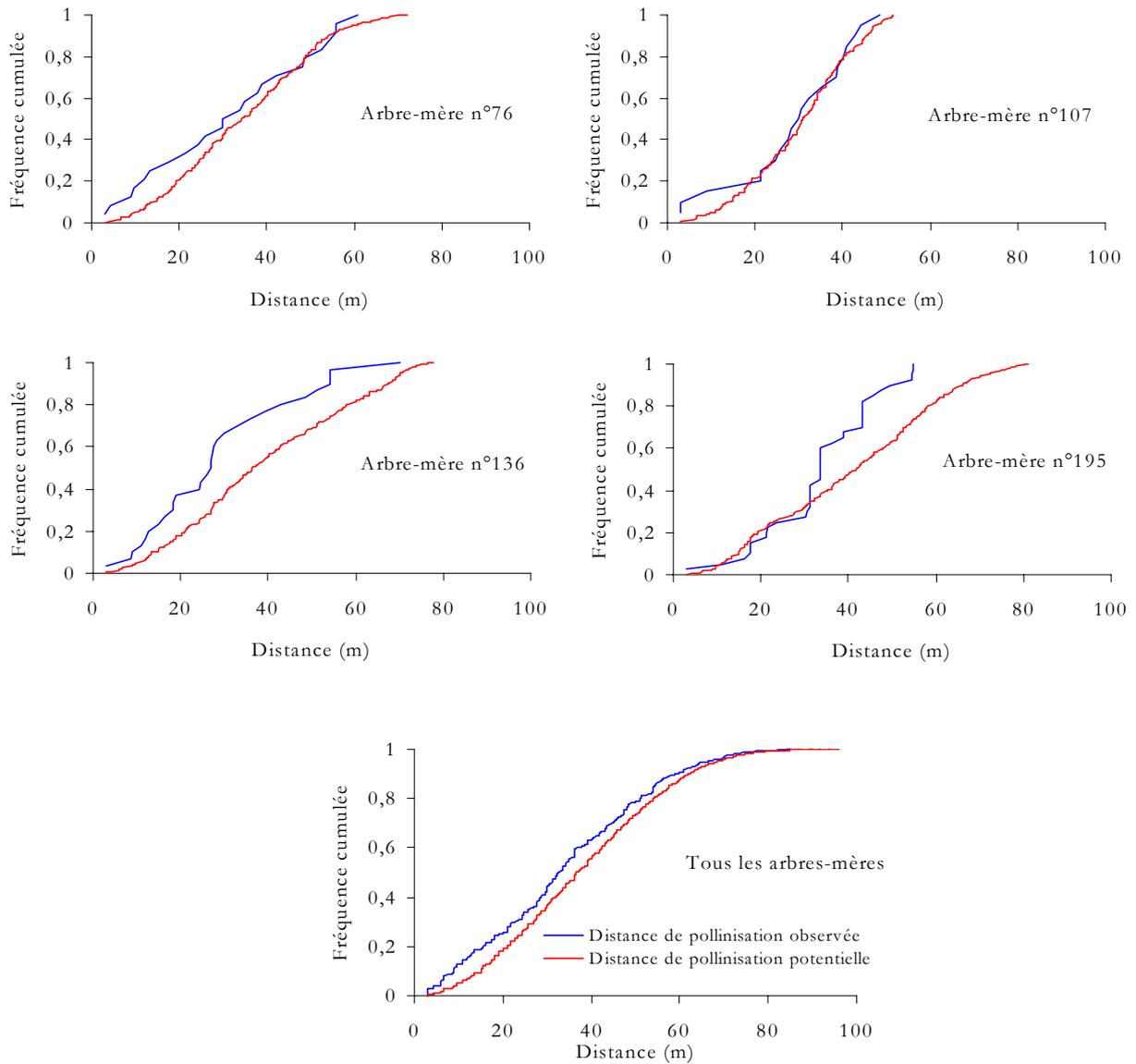


Figure 44. Comparaison des distances de pollinisation observée et potentielle pour 4 arbre-mères et l'ensemble des arbre-mères

fonction de la position des individus. L'arbre n°107 se situe au milieu de la parcelle tandis que l'arbre n° 195 est en bordure, de fait les distances potentielles sont plus élevées pour le second. Globalement, les distances observées sont peu différentes des distances potentielles mais nous mettons en évidence un léger excès de partenaires dans le proche voisinage. A des degrés divers, les quatre arbre-mères présentent des déséquilibres entre les deux distributions. Les effets de la distance sont différents pour les arbres n°136 et 195 (figure 44). Le premier appartient au groupe des individus dominés et les distances de pollinisations sont relativement différentes avec un excès de partenaires dans le voisinage immédiat. Le second est dominant, avec un léger déficit de croisements avec les proches voisins situés à moins de 30 mètres et un excès avec les individus au-delà de cette limite.

Nous avons testé les niveaux de signification de ces déséquilibres (annexe 8). En tenant compte de l'écartement entre les individus et de la taille du verger, les arbre-pères observés et potentiels ont été répartis par classes de distances avec des pas de 9 mètres. Pour les arbre-mères n°136 et 195, les résultats montrent des distributions significativement différentes. C'est à dire que les pères, au voisinage de l'arbre-mère n°136, contribuent significativement plus dans la descendance par rapport aux autres et inversement pour l'arbre n°195. En considérant l'ensemble des arbres-mères, nous ne mettons pas en évidence de différences significatives entre la distribution des pères potentiels et celles des pères observés. En conséquence, la position et la distance entre deux arbres dans le verger ne semblent pas avoir d'influence sur leur probabilité de croisement, à moins que ces arbres aient un phénotype particulier.

2.3 CONCLUSIONS SUR L'ESTIMATION DES FLUX DE GENES DANS LE VERGER

Nous avons montré l'existence probable de croisements préférentiels selon la période de la floraison. Ceux-ci sont gouvernés par le caractère précoce ou tardif des provenances, opposant celles d'Andranokobaka et d'Atherton à celles de Ravenshoe et de Paluma. Ceci revient à dire que la composition du nuage pollinique évolue au cours de la saison. Les contributions polliniques à l'origine de la descendance d'un individu sont différentes selon qu'il s'agisse d'un arbre fleurissant précocement ou tardivement. Mais au niveau du verger, sur l'ensemble d'une saison, les contributions potentielles des provenances à la constitution de la génération suivante ne sont pas différentes de leur effectif relatif dans le verger.

Les loci microsatellites choisis et leur variabilité allélique dans la population parentale permettent d'effectuer une analyse de paternité efficace. Le brassage génétique, dans le verger, est important, on trouve un nombre élevé de pères pour chaque arbre-mère qui, individuellement, contribuent peu au nuage pollinique. Sur l'ensemble des arbre-mères, la moitié des géniteurs du verger contribuent à la constitution du nuage pollinique. Globalement, il n'existe pas de direction préférentielle de pollinisation et le croisement entre deux individus est indépendant de la distance qui les sépare. Le nuage pollinique observé n'est pas exactement représentatif de la constitution de la population parentale. Nous observons des biais pour les provenances d'Andranokobaka et de Ravenshoe.

Le taux d'autofécondation moyen dans le verger est faible avec néanmoins des variations individuelles importantes. La proportion de descendants issus de croisement entre géniteurs apparentés est inférieure à 10%. La part, dans la descendance, du pollen extérieur au verger est de 39%, sans observer de relation entre les taux individuels de contamination et la position dans le verger, le phénotype (développement et phénologie) ou l'origine des arbres.

3. EVOLUTION DE LA DIVERSITE GENETIQUE ET VALEUR DE LA DESCENDANCE

Par rapport aux résultats présentés dans le chapitre précédent, plusieurs interrogations se posent :

- Comment évolue la diversité génétique entre deux générations successives ?
- Quelle est l'influence du type de croisement sur la croissance des descendants et donc sur la qualité de la variété produite ?
- En fonction de ces résultats, quel est leur impact sur l'estimation des paramètres génétiques ?

Avant de connaître la paternité de chacun, et pour les besoins de notre étude, une part d'entre eux (600 sur les 724) a été plantée en mai 1999 sur la station de Mahela. Dans le cadre du programme d'amélioration des eucalyptus, cet essai de descendance pourrait correspondre au type de parcelle classiquement mis en place pour passer à la génération suivante. Le dispositif expérimental est en blocs complets (4), la parcelle unitaire est constituée par une ligne de 5 plants soit au total 20 plants par famille (annexe 9). Avant la plantation, nous avons fait un tirage au hasard dans les descendance constituées par un nombre d'individus supérieur à 20. Pour ce sous-ensemble d'individus, nous disposons des données de croissance jusqu'à 37 mois et de l'origine maternelle et paternelle de chacun. Parmi les 600 individus, 279 ont une paternité externe au verger. Une partie des analyses repose sur les 321 individus dont on a identifié l'origine parentale.

A partir des données alléliques des 6 loci microsatellites, nous aborderons l'évolution de la diversité allélique entre la population parentale et les 724 descendants. Rappelons que ces individus n'ont fait l'objet d'aucune sélection pendant leur élevage en pépinière et avant leur plantation. Ensuite, nous évaluerons l'effet de l'apparentement sur les caractères de croissance et la productivité des descendants. Enfin, nous estimerons l'héritabilité des caractères de croissance qui nous permettra de juger de l'efficacité des dispositifs mis en place et de la sélection.

Tableau 33. Paramètres de diversité de la population de descendants pour les six locus

Locus	N	H_o	H_e	F
Embra06	1402	0.7375	0.8076	0.0891 **
Embra10	1412	0.8584	0.8660	0.0081 ns
Embra11	1398	0.6481	0.6965	0.0695 ns
Embra13	1440	0.7431	0.6260	-0.1871 ns
Embra15	928	0.5129	0.8009	0.3596 **
Embra19	1388	0.5793	0.6620	0.1249 **
Tous loci	-	0.6799	0.7435	0.0855 **

N : nombre d'haplotype, H_o, H_e : taux d'hétérozygotie observé et attendu,
 $F = 1 - (H_o / H_e)$, n.s., **: non significatif au seuil de 5%, significatif au seuil de 1%

Tableau 34. Variation allélique (perte/gain) entre la population parentale et la population de descendants

Locus	Gain	Perte	Total
Embra06	1	2	-1
Embra10	4	1	+3
Embra11	2	-3	-1
Embra13	1	3	-2
Embra15	1	6	-5
Embra19	4	0	+4
Total	13	15	-2

3.1 EVOLUTION DE LA DIVERSITE GENETIQUE

Nous nous intéressons ici à l'évolution de la diversité génétique entre la population parentale, constituée par le verger à graines, et les 30 descendance récoltées dans ce verger, composées de 20 à 61 demi-frères, étudiées précédemment. La population de descendants peut être subdivisée en deux sous-groupes. Nous avons d'une part, celui constitué par les individus dont la paternité est interne au verger à graines (440 descendants) et d'autre part, celui dont les individus ont une paternité externe (284 descendants). En conséquence, nous pouvons déduire les fréquences alléliques respectives des deux nuages polliniques.

3.1.1 Diversité allélique et taux d'hétérozygotie de la descendance

Le nombre moyen d'allèles par locus est de 16,7 dans la descendance étudiée. Selon les loci, il varie de 14 (Embra19) à 20 (Embra06). Le nombre total d'allèles de la population pour les 6 loci confondus est de 99. Comme dans la population de géniteurs, les loci Embra11, Embra13, Embra19 présentent des distributions déséquilibrées dans lesquelles un allèle a une fréquence allélique aux alentours de 0,5, les deux ou trois suivants ont une fréquence de 0,1 et les autres allèles ont des fréquences très basses (annexe 10). Les distributions alléliques des loci Embra06, Embra10 et Embra15 sont plus équilibrées.

Le taux moyen de diversité est aussi élevé que dans la population parentale, 0,68 contre 0,65. Le déficit en hétérozygotes, observé sur l'ensemble des descendants, par rapport aux proportions attendues sous l'équilibre de Hardy Weinberg, est de 8,5% (tableau 33). Les valeurs, au niveau des loci marqueurs, varient de façon importante puisque nous observons un déficit en hétérozygotes pour les marqueurs Embra10 (<1%), Embra11 (7%), Embra06 (9%), Embra19 (12%) et Embra15 (36%) et un excès d'hétérozygotes pour Embra13 (19%). Ces écarts par rapport à ce que l'on attend sous l'hypothèse de Hardy Weinberg sont significatifs pour les loci Embra06, Embra15 et Embra19 au seuil de 5%.

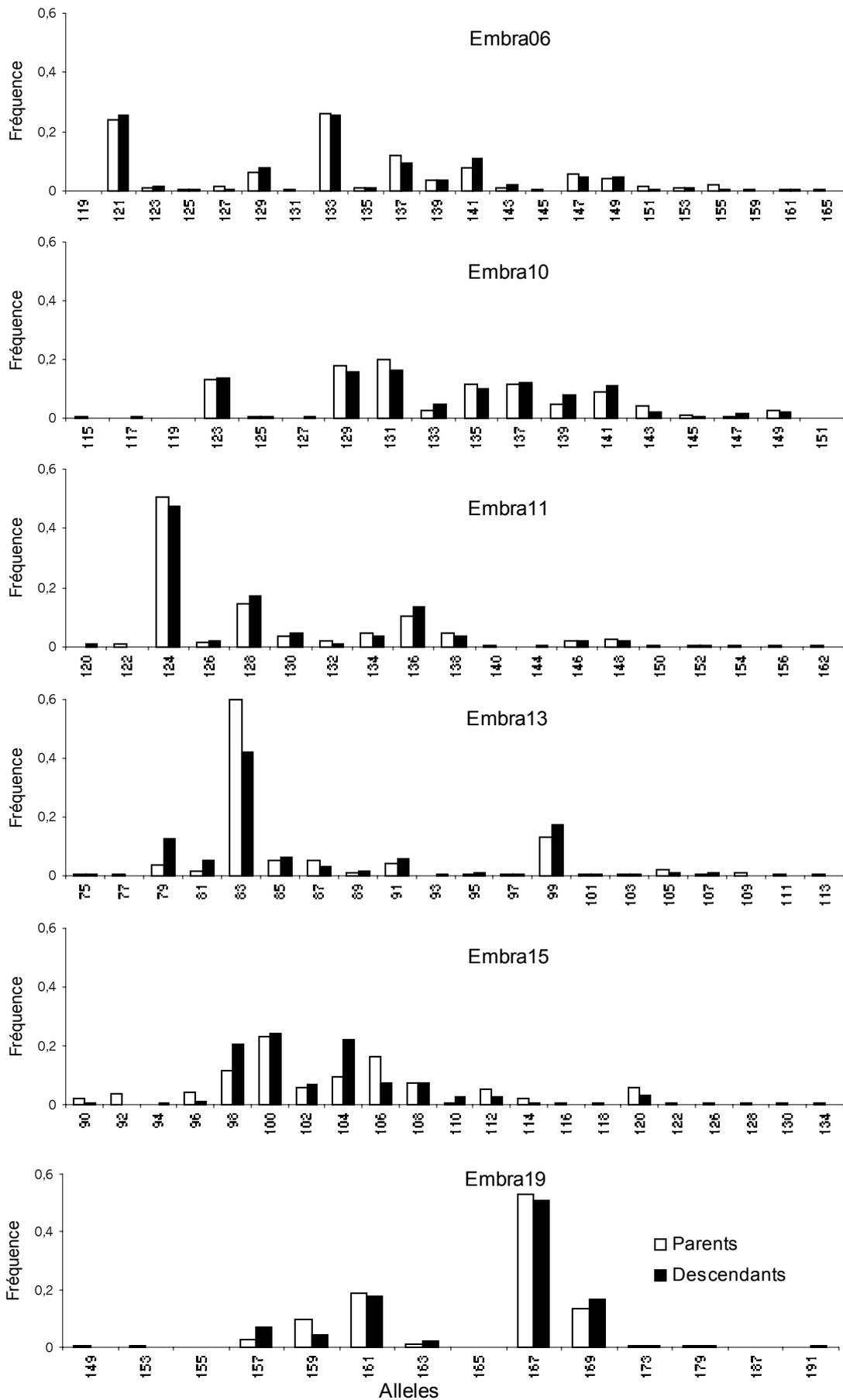


Figure 45. Comparaison des fréquences alléliques des géniteurs et des descendants en données diploïdes

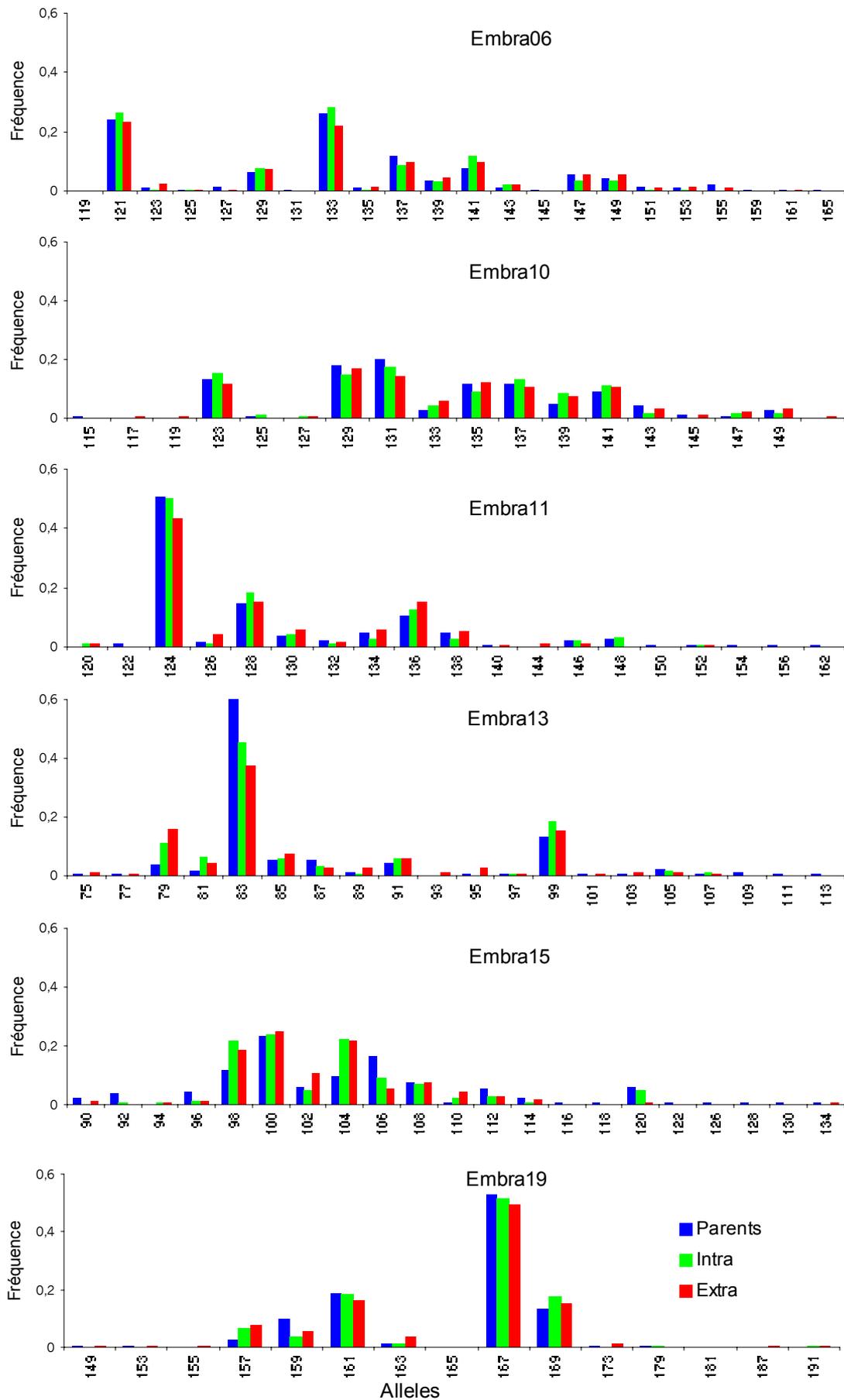


Figure 46. Comparaison des fréquences alléliques des géniteurs et des nuages polliniques interne et externe au verger

3.1.2 Comparaison de la diversité allélique entre les deux générations

3.1.2.1 Comparaison des distributions alléliques

Le nombre total d'allèles dans la population échantillonnée est respectivement de 101 et 99 pour les géniteurs et les descendants. Les pertes sont de 15 allèles, de 0 à 5 selon les locus, et les gains sont de 13 allèles, de 1 à 4 selon les locus (tableau 34, page précédente). Dans les deux populations, les fréquences de ces allèles sont très faibles.

Entre la population parentale et les descendants, les fréquences alléliques diffèrent très faiblement pour les loci Embr06, Embra10, Embra11 et Embra19. Par contre, nous observons de légères variations pour certains allèles des loci Embra13 et Embra15 (figure 45) mais elles concernent les allèles relativement fréquents dans les deux populations. En dehors de ces variations de fréquences, nous observons les mêmes allèles pour tous les locus dans les deux populations et les profils alléliques restent très proches.

Sachant que 39% des descendants ont une paternité externe au verger, les similitudes entre les deux populations, au niveau allélique, doivent faire l'objet d'analyses plus approfondies et elles feront l'objet d'un point de discussion particulier.

3.1.2.2 Comparaison des distributions alléliques au niveau haploïde

Pour lever les premières ambiguïtés, nous avons distingué les deux catégories de descendants selon leur origine paternelle et nous avons reconstitué deux nuages polliniques haploïdes. Ils sont respectivement constitués par les allèles provenant de géniteurs mâles identifiés dans la parcelle (au plus 440 allèles par locus) et par les allèles provenant de géniteurs mâles identifiés en dehors de la parcelle (au plus 284 allèles par locus). Nous avons enlevé la part des allèles maternels pour tous les descendants où il n'y avait pas de doute. Pour 10% d'entre eux, nous n'étions pas en mesure de distinguer l'origine paternelle et maternelle des allèles, nous avons fait un tirage aléatoire des allèles.

Les distributions des fréquences alléliques des deux nuages polliniques et de la population parentale sont présentées dans la figure 46. En dehors des loci Embra13 et Embra15, les fréquences alléliques ne varient ni entre les géniteurs et les nuages polliniques, ni entre les deux nuages polliniques. Les similitudes observées entre les géniteurs et le nuage pollinique intra montrent que les géniteurs du verger ayant contribué à la génération suivante constituent un bon échantillonnage de la population parentale.

Tableau 35. Caractéristiques générales de la croissance d'*E. grandis* dans l'essai de descendance

Caractère	Age (mois)	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Minimum	Maximum
Hauteur (cm)	9	231	62	27	60	420
	12	470	86	18	100	660
	23	841	145	17	255	1230
	31	1065	180	17	264	1470
	37	1255	219	17	448	1750
Circonférence au collet (cm)	9	13,8	2,8	20	5	22
	23	38,0	6,6	17	6	55
	31	41,6	7,7	19	6	62
	37	47,1	9,1	19	13	70
Circonférence à 1,3 mètre (cm)	12	15,5	3,6	24	1	30
	23	28,3	5,5	19	4	41
	31	33,9	6,8	20	4	49
	37	37,6	7,6	20	9	55
Circonférence à 2 mètre (cm)	31	31,8	6,7	21	3	47
	37	35,6	7,6	21	7	55
Volume individuel (dm ³)	9	1,32	0,81	61	0,04	5,4
	12	4,2	2,2	53	0,01	16,5
	23	29,8	12,0	40	0,33	70,6
	31	51,7	21,2	41	0,35	113,2
	37	71,5	31,0	43	2,25	157,9

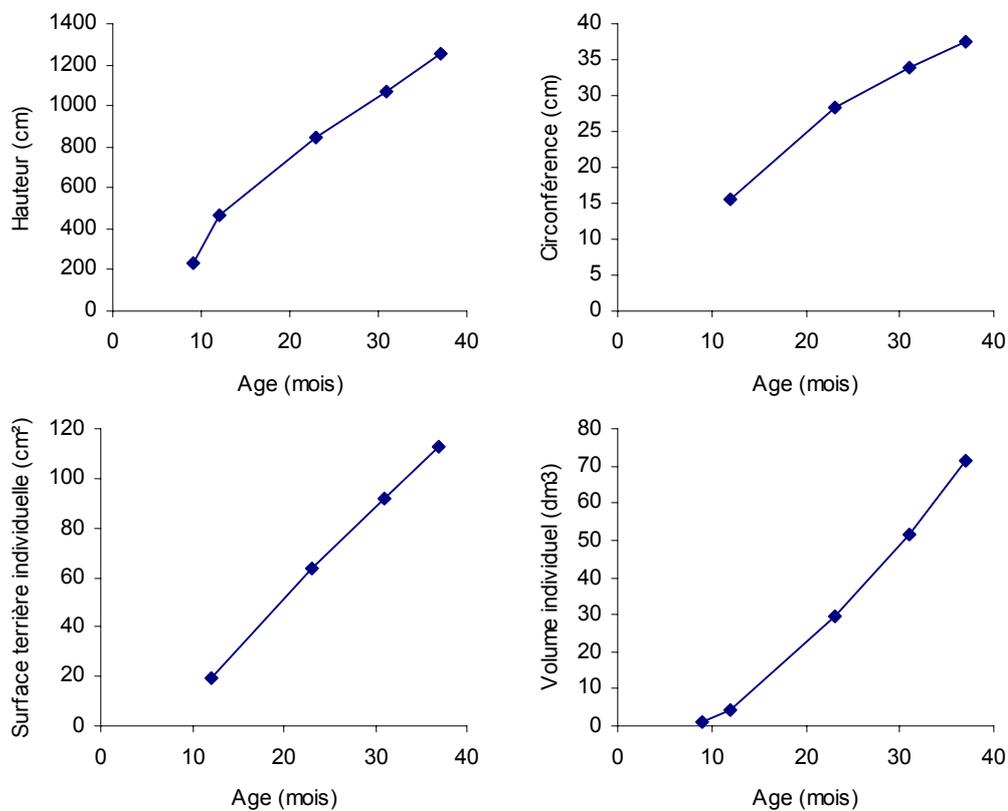


Figure 47. Courbes de croissance, de 9 à 37 mois, de l'essai de descendance

3.2 INFLUENCE DU TYPE DE CROISEMENT SUR LA VALEUR DES DESCENDANTS

3.2.1 Les différents types de croisement observés

A partir des résultats de l'analyse de paternité nous avons identifié, pour 321 descendants de l'essai, le type de croisement lié au degré d'apparentement entre les géniteurs :

- autofécondation : **18 individus** ;
- croisements entre demi-frères : **38 individus** ;
- croisements intra provenances avec apparentement possible mais inconnu entre les géniteurs : **67 individus** ;
- croisements inter provenances en prenant comme hypothèse qu'il n'y pas d'apparentement entre les géniteurs : **198 individus**.

3.2.2 Comportement général de la population

A 37 mois, la hauteur moyenne de l'essai était de $12,5 \pm 2,2$ mètres correspondant à un accroissement moyen annuel de 4 mètres (tableau 35). La circonférence moyenne est de 47 ± 9 centimètres soit un diamètre moyen de 16 centimètres et la productivité atteignait $19 \text{ m}^3\text{ha}^{-1}\text{an}^{-1}$ à 3 ans. Les valeurs extrêmes pour ces caractères étaient de 448 et 1750 centimètres pour la hauteur, 13 et 70 centimètres pour la circonférence et 2,3-158 dm^3 pour le volume individuel. Le peuplement était, à cet âge, encore en pleine croissance que ce soit en hauteur ou en diamètre (figure 47) et les effets de compétition n'étaient pas encore perceptibles. Pour tous les caractères considérés, les coefficients de variation diminuent jusqu'à 23 mois pour se stabiliser au-delà (tableau 35).

Tableau 36. Résultats de l'analyse de variance de l'essai de descendance de 9 à 37 mois - Effets famille et type de croisement

Caractère	F	ddl	9 mois	12 mois	23 mois	31 mois	37 mois
Hauteur	F famille	28	1,42 n.s.	1,28 n.s.	2,29 ***	2,47 ***	2,19 ***
	F croisement	3	7,69 ***	7,11 ***	8,01 ***	8,93 ***	5,91 ***
Circonférence	F famille	28	-	1,88 **	1,71 *	2,02 **	2,21 **
	F croisement	3	-	9,51 ***	12,12 ***	12,12 ***	14,02 ***
Volume	F famille	28	1,50 n.s.	1,96 **	2,02 **	2,55 ***	2,41 ***
	F croisement	3	7,01 ***	7,96 ***	10,14 ***	8,40 ***	10,19 ***

(n.s., *, **, *** : non significatif au seuil de 5%, significatif au seuil de 5, 1, 0,1%)

Tableau 37. Comparaison de la valeur agronomique des descendants entre les différents niveaux d'apparement des géniteurs

Caractère	Croisement	9 mois			12 mois			23 mois			31 mois			37 mois		
		2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4
Hauteur	1	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	0,006	<0,001
	2	-	0,954	0,610	-	0,453	0,062	-	0,430	0,167	-	0,654	0,068	-	0,489	0,242
	3	-	-	0,538	-	-	0,257	-	-	0,569	-	-	0,013	-	-	0,039
Circonférence	1	-	-	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	-	-	-	-	0,628	0,026	-	0,237	0,033	-	0,2280	0,005	-	0,388	0,022
	3	-	-	-	-	-	0,066	-	-	0,356	-	-	0,1064	-	-	0,141
Volume	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	-	0,219	0,597	-	0,743	0,116	-	0,416	0,175	-	0,390	0,032	-	0,652	0,086
	3	-	-	0,387	-	-	0,191	-	-	0,609	-	-	0,192	-	-	0,186

(1, 2, 3, 4 : respectivement croisement en autofécondation, entre demi-frères, deux arbres de même provenance et entre deux arbres de provenances différentes, Probabilités test T, souligné : significatif au seuil de 5%).

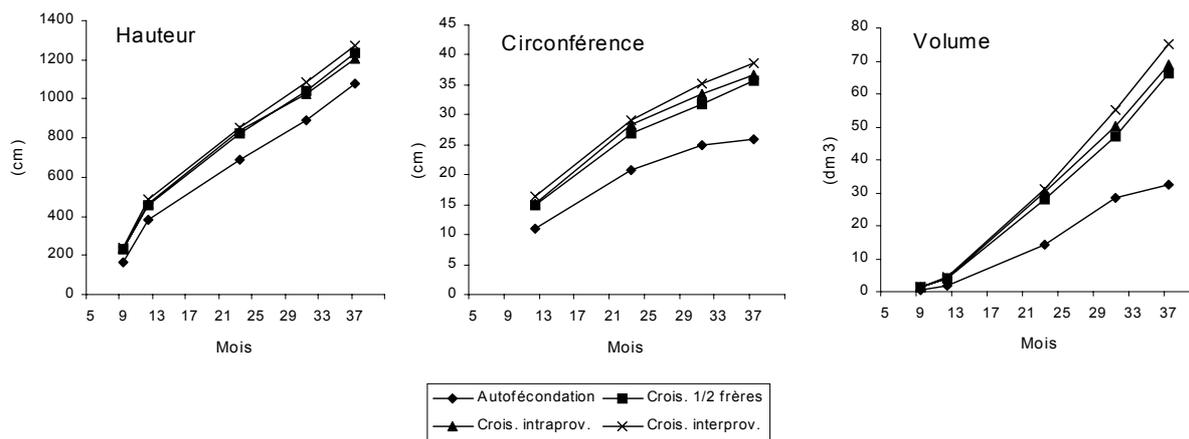


Figure 48. Courbes de croissance, de 9 à 37 mois, en hauteur, circonférence et volume des descendants selon le degré d'apparement des géniteurs

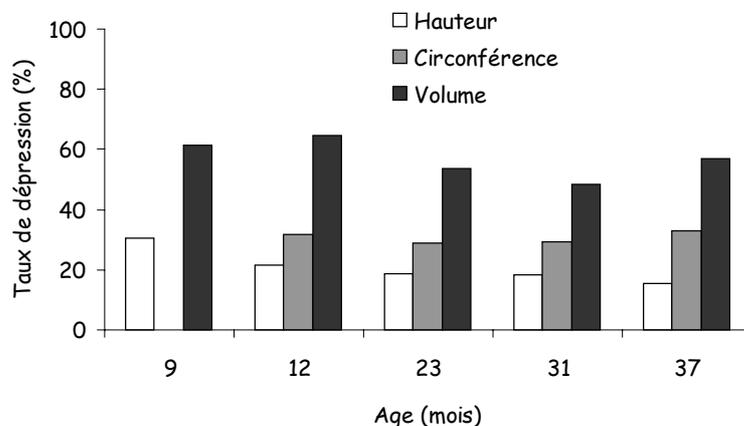


Figure 49. Effet de la dépression consanguine due à l'autofécondation sur la valeur agronomique des descendants après une génération (pas de mesure à 9 mois pour la circonférence à 1,3 m)

3.2.3 Effet du type de croisement sur la croissance des individus

Nous avons utilisé le modèle mixte d'analyse de variance à deux critères de classification (famille et type de croisement) :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Où :

Y_{ijk} est la valeur pour le caractère considéré de la famille i du croisement j de l'individu k

μ = moyenne de l'essai

α_i = effet de la famille i de variance σ_i^2 , $i = 1, \dots, 29$

β_j = effet fixe du type de croisement j , $j = 1, \dots, 4$ (1 : autofécondation, 2 : croisement entre 1/2 frères, 3 : croisement intra-provenance, 4 : croisement inter-provenance)

ε_{ijk} = erreur résiduelle de variance σ_e^2

L'analyse de la variance montre des effets significatifs du type de croisement que ce soit sur la hauteur, la circonférence ou le volume (tableau 36). Quel que soit l'âge ou le caractère de croissance, les descendants provenant des événements d'autofécondation se distinguent de manière significative avec les autres types de croisements (tableau 37). L'expression de la dépression consanguine liée à l'autofécondation est estimée par la comparaison des caractères de croissance à un âge donné. La comparaison des courbes de croissance montre pour la circonférence et le volume, que l'expression de la consanguinité augmente avec l'âge au moins jusqu'à 37 mois, cette tendance est moins évidente pour la croissance en hauteur (figure 48). En comparant la moyenne de ces caractères des individus autofécondés et ceux issus de croisements entre géniteurs apparentés, le taux de dépression consanguine varie selon le caractère de croissance (figure 49) :

- il diminue de 32 à 18% sur la hauteur ;
- il se maintient aux alentours de 35% pour la circonférence ;
- il se situe entre 50 et 65% au niveau du volume.

Cet effet est moins marqué en comparant les individus issus de croisement entre demi-frères et ceux issus de géniteurs non apparentés. Le taux de dépression consanguine atteint, respectivement 5, 10 et 17% sur la hauteur, la circonférence et le volume.

3.2.4 Analyse génétique de l'essai de descendance

L'analyse des effets génétiques correspondant aux 30 familles de demi-frères passe par l'estimation des composantes de la variance génétique dans la population. Elle repose sur les données d'inventaires recueillies de 9 à 37 mois.

En éliminant les individus issus d'autofécondation et ceux des croisements entre demi-frères, le plan de croisement est constitué de 265 descendants mettant en jeu 29 géniteurs femelles et 146 géniteurs mâles, soit 235 combinaisons. Le nombre de descendants par géniteurs mâles ou femelles n'est pas suffisant pour reconstituer un plan de croisement suffisamment complet pour estimer les effets additifs et les effets de dominance.

3.2.4.1 Ajustement du dispositif

L'estimation des paramètres génétiques dépend de la robustesse du dispositif, nous avons donc cherché à l'optimiser. Avant d'utiliser le modèle d'analyse présenté précédemment, nous avons vérifié, dans l'essai, l'existence ou non d'effets terrains liés soit à la topographie ou à la fertilité du sol. Nous avons découpé l'essai en ligne et en colonne correspondant aux lignes de plantations (annexe 9). Nous avons utilisé le modèle mathématique suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Où :

Y_{ijk} est la valeur pour le caractère considéré de l'arbre k placé à l'intersection de la ligne i et de la colonne j

μ = moyenne de l'essai

α_i = effet fixe de la ligne i , $i = 1, \dots, 30$

β_j = effet fixe de la colonne j , $j = 1, \dots, 20$

ε_{ijk} = erreur résiduelle de variance σ_e^2

Nous avons mis en évidence des effets lignes et colonnes significatifs. La croissance en hauteur des arbres est inférieure dans les zones marginales du verger (figure 50, page suivante). La fertilité des sols est plus faible quand le terrain est en pente. Sur cette base, nous avons modifié le dispositif expérimental (annexe 11) en :

- regroupant les lignes 2 à 2, soit 10 groupes horizontaux ;

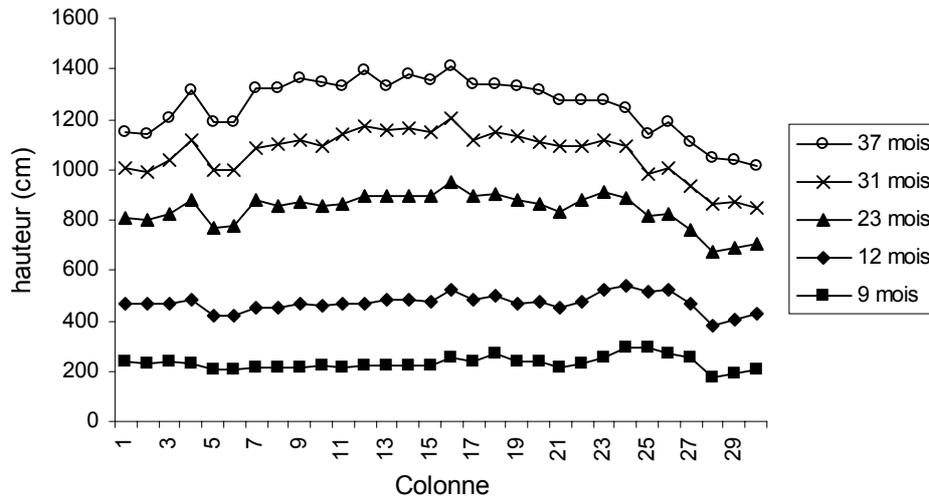


Figure 50. Comparaison de la hauteur moyenne par colonne de l'essai de descendance

Tableau 38. Résultats de l'analyse de variance de l'essai de descendance de 9 à 37 mois - Effets familles sur les caractères de croissance

Caractère	F	ddl	9 mois	12 mois	23 mois	31 mois	37 mois
Hauteur	F _{famille}	29	1,21 n.s.	1,77 **	2,65 ***	2,76 ***	2,67 ***
Circonférence collet	F _{famille}	29	1,01 n.s.	-	1,36 n.s.	1,43 n.s.	2,01 **
Circonférence à 1,3 mètres	F _{famille}	29	-	1,85 **	1,56 *	1,77 **	2,06 **
Circonférence 2 mètres	F _{famille}	29	-	-	-	1,99 **	1,97 **
Volume	F _{famille}	29	1,18 ***	1,97 **	1,83 **	2,34 ***	2,39 ***

(n.s., *, **, *** : non significatif, significatif au seuil de 5, 1, 0,1%)

Tableau 39. Estimation des héritabilités individuelles et familiales calculées à partir des données recueillies dans l'essai de descendance

Caractères	Héritabilité	9 mois	12 mois	23 mois	31 mois	37 mois
Circonférence à 1,3 mètres	h^2	-	0,32	0,29	0,33	0,40
	h^2_f	-	0,38	0,35	0,39	0,44
Circonférence au collet	h^2	0,19	-	0,22	0,30	0,48
	h^2_f	0,26	-	0,29	0,36	0,48
Hauteur	h^2	0,22	0,33	0,43	0,39	0,38
	h^2_f	0,29	0,38	0,46	0,43	0,42
Volume	h^2	0,28	0,34	0,40	0,47	0,39
	h^2_f	0,34	0,39	0,43	0,48	0,43

- créant 6 colonnes correspondant aux parcelles de 5 plants soit 6 groupes verticaux ;
- les données brutes ont été ajustées par rapport à ce nouveau découpage de l'essai.

Suite à cela nous avons effectué une analyse de la variance à un seul critère de classification en considérant les variables ajustées en randomisation totale, selon le modèle mathématique suivant :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Où :

Y_{ij} est la valeur pour le caractère considéré de l'individu i de la descendance j

μ = moyenne de l'essai

α_i = effet de la famille de variance σ_i^2 , $i = 1, \dots, 30$

ε_{ijk} = effet milieu de variance σ_e^2

3.2.4.2 Estimations des effets génétiques

Les résultats montrent que les effets familles sont significatifs à partir de 12 mois et qu'ils augmentent avec l'âge (tableau 38). L'estimation de l'héritabilité pour les caractères de croissance à chaque âge est présentée dans le tableau 39. Les valeurs d'héritabilité familiale indiquent la part des effets familles dans la variance totale. Elles atteignent des valeurs moyennes comprises entre 0,4 et 0,5. L'héritabilité au niveau famille est supérieure à l'héritabilité au niveau individuel. Ce résultat est normal compte tenu du fait que l'estimation de l'héritabilité familiale prend en compte les effets génétiques additifs et non additifs. A 37 mois, l'héritabilité au niveau individuel est plus élevée pour la circonférence à 1,3 mètre. La circonférence reste donc le caractère sur lequel, à cet âge, la sélection devrait être la plus efficace.

Nous avons calculé la valeur du coefficient de corrélation entre les caractères de croissance des arbres-mères et des descendants à des âges similaires, 41 mois pour les géniteurs et 37 mois pour les descendants et à l'âge de la récolte soit 126 mois pour les géniteurs. Dans ce but, nous avons pris les valeurs ajustées par rapport aux effets terrains dans les deux essais. Les coefficients de corrélations se sont révélés nuls quel que soit l'âge et le caractère considérés. L'explication la plus probable vient du fait que nous avons une mauvaise estimation des valeurs familiales et donc de l'héritabilité. Mais d'autres interprétations peuvent être avancées, qu'il s'agisse des effets de dominance ou d'épistasie ou encore des interactions génotype-environnement du seul fait des différences écologiques entre les deux stations.

3.3 CONCLUSIONS

Les fréquences alléliques de la population parentale et de sa descendance ne montrent pas de différences importantes. Les pertes et les gains en allèles, qui se compensent, ne concernent que les allèles dont les fréquences alléliques sont très faibles. En dehors de 3 ou 4 allèles pour Embra13 et Embra15, nous ne mettons pas en évidence d'évolution majeure entre les deux populations. En comparant les fréquences alléliques du nuage pollinique, en données haploïdes, nous n'observons pas de variation significative avec celles des géniteurs.

Il ressort que les distributions alléliques entre les deux jeux de données haploïdes, correspondant aux nuages polliniques interne et externe, sont très proches. Le nuage pollinique externe présente des similarités importantes avec la population parentale. Nous aurions pu nous attendre à observer des variations plus importantes d'autant que nous pouvions suspecter des croisements interspécifiques avec *E. robusta*, très présent dans la région et dans l'environnement le plus immédiat du verger.

La stabilité des fréquences alléliques entre les géniteurs et les descendants montre, d'une part, que nous avons choisi un échantillon représentatif d'arbre-mères et qu'il confirme le niveau élevé du brassage génétique observé à partir de l'analyse de paternité. Un nombre plus restreint d'individus dans la constitution du nuage pollinique aurait entraîné des effets de dérive et se serait traduit par des modifications dans la distribution allélique.

L'essai de descendance est situé sur la station de Mahela, distante de 120 kilomètres du verger à graines, dans des conditions écologiques différentes (pluviométrie supérieure de 50% et température moyenne annuelle plus élevée de 4°C). Néanmoins, l'espèce est bien adaptée et montre le niveau de plasticité de l'espèce. Le type de dispositif retenu n'est pas suffisamment robuste pour l'estimation de la valeur génétique des familles. Ceci pose un problème dans la mesure où les vergers à graines sont destinés à plusieurs objectifs, en particulier à estimer les paramètres génétiques pour une meilleure efficacité de la sélection.

QUATRIEME PARTIE
DISCUSSION ET CONCLUSION

QUATRIÈME CHAPITRE - DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous allons d'abord rappeler la problématique de l'étude et les principaux résultats obtenus, liés à la caractérisation des flux de gènes dans le verger à graines d'*E. grandis*, par les différentes approches : la croissance et la phénologie de la population parentale, les flux de pollen potentiels et réels, les conséquences sur la valeur de la variété produite. Nous en déduirons les implications, tirées des résultats et des discussions, sur la stratégie d'amélioration des espèces forestières à Madagascar et les propositions pouvant être faites pour une meilleure gestion des vergers à graines

1. RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE

La production de variétés adaptées au reboisement à Madagascar est assurée par les vergers à graines menés en pollinisation libre. Ils constituent l'outil principal de l'amélioration de plusieurs espèces d'eucalyptus et du maintien de la variabilité génétique des populations d'un cycle à un autre. Cette approche permet de produire, à moindre coût, des variétés destinées au reboisement villageois qui constitue une des principales actions dans les stratégies de développement et de protection de l'environnement.

La qualité des variétés, la stabilité de la production et le maintien d'un certain niveau de variabilité génétique sont conditionnés par la reproduction panmictique entre les individus. Malgré les précautions prises lors de l'établissement de la parcelle et durant sa gestion, les facteurs principaux, sources d'écarts à la panmixie, sont liés à la variabilité intra-spécifique : i) de la croissance ; ii) de la phénologie des populations d'amélioration ; iii) et de leur interaction avec l'environnement. L'ensemble caractérise les flux de pollen dans les vergers à graines d'eucalyptus. En conséquence, l'efficacité de la production des vergers s'estime par une meilleure compréhension de la reproduction au sein de ceux-ci. Elle conditionne la conservation de la diversité génétique ou, *a contrario*, la dérive génétique avec des conséquences importantes dans l'amélioration des espèces.

2. RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS

Les observations sur les géniteurs du verger à graines d'*E. grandis* conduisent à des résultats importants sur la compréhension de la reproduction du verger. Nous allons les rappeler sommairement avant de les discuter.

Comme pour la croissance, l'espèce montre, au niveau de la floraison, une bonne adaptation aux conditions écologiques de la zone d'étude. Les provenances originaires des zones à pluies estivales, caractérisant le climat de Madagascar, sont les plus adaptées au niveau de la croissance et ont un comportement phénologique particulier. Chaque année, le taux de floraison du verger est élevé et sa durée est, de façon régulière, de l'ordre de 3 mois. Plus de 50% des arbres sont en fleur simultanément sur une période d'un mois et demi. Ceci est susceptible de contribuer favorablement au brassage génétique dans le verger. Nous avons mis en évidence, plus spécifiquement en début et en fin de saison, l'existence de croisements préférentiels potentiels. Par opposition à celles du sud, les provenances du nord de l'aire naturelle sont plus précoces.

L'analyse de paternité, basée sur les données microsatellites des géniteurs et des descendants, montre un brassage génétique important dans le verger, avec peu d'autofécondations et peu de descendants plein-frères. Ces observations correspondent aux caractéristiques de la floraison, évoquées précédemment, et aux faibles variations de la variabilité allélique observée entre les deux générations. En effet, la diversité et les fréquences alléliques sont très proches entre les deux générations. Les pertes et les gains alléliques s'équilibrent, ils correspondent aux allèles en fréquence très faible dans les populations. Ceci est d'autant plus surprenant que le taux moyen de pollution pollinique, dans notre échantillon, est de 39%.

Enfin, l'analyse des données de croissance de l'essai de descendances, combinée avec l'origine parentale des individus, montre que les effets de la dépression consanguine sont fortement marqués sur les seuls arbres issus d'autofécondation.

3. DISCUSSIONS

3.1 CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION PARENTALE

3.1.1 Diversité génétique

La population parentale présente une variabilité allélique importante. En ce qui nous concerne, malgré la sélection et le nombre restreint de géniteurs dans le verger étudié, le niveau de diversité demeure élevé et il est probablement suffisant pour constituer la population de base de l'espèce dans le schéma d'amélioration. Il serait intéressant, comme Leite *et al.* (1997), de le comparer au niveau de diversité de l'espèce. Avec des marqueurs RAPD, sur un sous-groupe de 74 individus sur 336 géniteurs constituant leur population de base, ces auteurs ont observé un niveau de diversité de leur population de base similaire à celui de l'espèce.

La diversité génétique intra population explique près de 90% de la diversité totale. Ce niveau de différenciation est similaire aux résultats présentés dans la littérature sur les espèces forestières, en particulier les eucalyptus, qui présentent des aires de répartition importantes donc des tailles de population élevées et des systèmes de reproduction allogames stricts ou préférentiels (Hamrick *et al.* 1992, Moran 1992, House et Bell 1996).

Le déficit en hétérozygotes dans la population parentale d'*E. grandis*, par rapport au taux d'hétérozygotes attendu sous l'équilibre de Hardy Weinberg, est évalué à 9%. L'origine de ces déviations en hétérozygotes est probablement due à l'effet de Walhund par le regroupement de plusieurs sous-populations en équilibre ayant des fréquences alléliques différentes. Néanmoins, il s'agirait de vérifier la présence d'allèles nuls notamment pour les loci Embra13 et Embra19.

3.1.2 Développement et croissance

La variabilité des caractères de croissance dans la population, y compris ceux liés à la taille du houppier, s'explique par des effets familles et provenances. Comme l'on montré plusieurs auteurs (Bouvet et Andrianirina 1990, Huoran *et al.* 1994, Lebot et Ranaivoson 1994), les provenances testées originaires de la région d'Atherton dans le verger se distinguent de celles situées plus au sud de l'aire naturelle. Les arbres sont plus adaptés et leur croissance supérieure. La variabilité est plus élevée à l'intérieur des populations pour les raisons invoquées précédemment (taux d'allogamie, taille des populations d'origines).

Les arbres d'Andranokobaka proviennent d'une introduction plus ancienne. Cette provenance est constituée par trois familles dont deux sont issues de récoltes effectuées sur des individus originaires d'Atherton dans un essai antérieur. Le comportement particulier de ces familles s'explique par l'origine des arbres-mères, les effets de la sélection et de l'hétérosis. Compte tenu de l'abondance des eucalyptus à Madagascar et de l'existence de croisements interspécifiques naturels, il est probable que ces familles, produites en pollinisation libre, présentent un certain degré d'introgession. De la même manière que Rockwood et Meskinen (1991), nous pouvons nous poser la question de l'opportunité de mélanger, au sein d'un verger, des populations ayant une histoire évolutive différente.

Pour l'ensemble des caractères étudiés, les géniteurs présentent une variabilité phénotypique importante ayant des conséquences sur l'architecture du peuplement. Les différences de développement conduisent à la coexistence de plusieurs types d'arbres pouvant correspondre à autant de groupes de croisements préférentiels et conduire à des biais dans les flux de pollen. Patterson *et al.* (2001), dans un verger à graines d'*E. globulus*, ont montré que le taux d'allogamie variait selon le niveau de la canopée et que plusieurs cohortes d'insectes pollinisateurs, n'ayant pas forcément la même efficacité pollinisatrice, coexistent dans les houppiers.

3.1.3 Phénologie et pollinisation

Dans les conditions écologiques de notre étude, l'*E. grandis* fleurit au moins dès l'âge de 9 ans. La phénologie des eucalyptus est associée au cycle de croissance végétative (House 1997). La floraison débute lorsque la phase de croissance est moins importante, c'est à dire lorsque les pluies se sont arrêtées depuis un mois et que les températures commencent à devenir fraîches. Le verger fleurit annuellement sur une période de 4 mois. Le taux moyen de floraison annuel atteint près de 85%. Seulement trois arbres sur les 242 du plateau central n'ont jamais fleuri. L'abondance de la floraison dans le verger, en périphérie des houppiers, constitue un avantage comparatif pour l'attraction des pollinisateurs. Mais elle peut aussi favoriser la population de prédateurs de l'espèce dont nous n'avons pas révélé la présence (Anderson et Hill 2002, Herrmann 1984). Nos observations correspondent aux résultats obtenus dans l'aire naturelle (Florence 1996, House 1997, Law *et al.* 2000) ou en Afrique du Sud (Hodgson 1976a, Jones et Staden 2001). Ils confirment l'excellente adaptation biologique de l'espèce et le bon choix des provenances au regard des conditions climatiques du site d'étude. Griffin (1980), pour *E. regnans*, a montré la régularité annuelle de la dynamique florale et a mis en évidence la variabilité

intraspécifique de la dynamique de floraison.

Le pic de floraison du verger (quand plus de 50% des arbres sont en fleur) est relativement étroit mais dans l'ensemble, les arbres fleurissent pendant quatre mois. Nous avons mis en évidence l'existence de familles et de provenances précoces ou tardives, en suggérant un contrôle génétique, de la même manière que Griffin (1980) pour *E. regnans*. Cette variabilité intraspécifique de la floraison, observée annuellement, nous permet de conclure à l'existence probable de croisements préférentiels au cours du temps. Les provenances d'Andranokobaka et d'Atherton, les plus adaptées de point de vue de la croissance, sont plus précoces par opposition à celles de Ravenshoe et de Paluma. Néanmoins, nous n'avons pas observé de relation entre la phénologie et le taux de contamination pollinique.

Nous avons observé une proportion élevée d'abeille domestique (*Apis mellifera*) et la présence de nombreux insectes dont quelques diptères pollinisateurs. Nos observations ne sont que partielles et comme le suggère House (1997), il est probable que plusieurs groupes d'insectes se succèdent durant la floraison du verger. A Madagascar, l'apiculture est particulièrement bien développée et bénéficie, dans la région, des grandes étendues en eucalyptus et en *Acacia dealbata*. Davis (1997) a montré que les abeilles étaient préférentiellement attirées par le type de nectar d'*E. grandis*. Dans l'aire naturelle d'*E. costata* (Horskins et Turner 1999) et d'*E. globulus* (Hingston et Potts 1998), plus de cinquante espèces d'insectes différentes ont été observées avec une proportion d'abeilles domestiques importante (> 60%) introduites en Australie. Elles ont un comportement spécifique bien connu qui est susceptible de favoriser l'autofécondation, d'autant que chez *E. grandis*, les fleurs d'une même inflorescence fleurissent de façon synchrone. Les abeilles se maintiennent sur la même source de pollen et de nectar et y reviennent à leur retour de la ruche (Jackson 1996, Nathan *et al.* 1999). Paradoxalement, plusieurs auteurs ont montré que l'introduction de ruches dans les plantations ou les vergers à graines augmentait le taux d'allogécondation en particulier pour *E. alba*, *E. camaldulensis*, *E. diversicolor*, *E. globulus*, *E. nitens* que ce soit dans l'aire naturelle (Moncur et Kleinschmidt 1992, Moncur *et al.* 1993, Moncur *et al.* 1995,) ou en zone d'introduction (Hardi et Kanso 1995). Dans ce contexte, l'allogamie serait, en partie, liée à l'échange de pollen au sein des ruches (Free et Williams 1972, Vaissière *et al.* 1996).

3.1.4 Fructification

Les conditions environnementales du verger sont favorables à une production grainière régulière

et importante. Dans la zone d'étude, *E. grandis* fructifie annuellement à l'inverse de nombreuses espèces d'eucalyptus qui pourtant initient des fleurs chaque année (House 1997). Les quantités de graines viables, par capsule ou par gramme, liées en partie à l'efficacité pollinisatrice des insectes, sont supérieures à celles de la littérature (Hogdson 1976a, Boland *et al.* 1980). Une étude plus approfondie sur le rôle de cette efficacité aurait permis de préciser les facteurs principaux conduisant à nos résultats. En dehors des aspects purement grainiers, House (1997) a montré, sur *E. stellulata*, que le ratio capsules sur fleurs varie significativement durant la saison de floraison, et les valeurs sont les plus élevées quand la présence d'insectes est la plus importante.

Nos résultats pourraient s'expliquer par la proximité des houppiers dans le verger qui semble favoriser le rendement grainier à travers l'augmentation probable du taux d'allogamie. Burrows (1995, 2000) montre, pour deux espèces différentes (*E. albens* et *E. melliodora*), que les arbres isolés ou situés en forêt claire portent des capsules contenant moins de graines et que celles-ci ont un pouvoir germinatif plus faible par rapport aux graines récoltées sur des individus en peuplements fermés. Cet auteur explique ces différences par des flux de pollen insuffisants vers les arbres isolés favorisant l'autofécondation dont la conséquence principale conduit à la diminution du nombre de graines par capsule et par gramme. Ceci montrant tout l'intérêt d'estimer l'intensité de la floraison et d'étudier l'influence de la répartition spatiale des arbres dans le verger sur leur phénologie.

Il aurait été intéressant de considérer la morphologie des graines et particulièrement leur taille. En effet Turnbull et Doran (1987), comme Burrows (1995) ont montré que les graines d'eucalyptus les plus grosses ont un pouvoir germinatif supérieur, une dynamique de germination plus élevée et que la croissance des plants correspondants était supérieure. De même chez *E. globulus*, les plantules issues des graines les plus petites présentent une proportion plus élevée d'individus anormaux (Martins-Corder *et al.* 1998).

Le rendement grainier des capsules produites en autofécondation, est significativement plus faible par rapport aux autres types de croisement. Ceci revient à dire que la contre-sélection des individus autofécondés est élevée chez *E. grandis* tout comme chez *E. camaldulensis* (James et Kennington 1993). Le taux de remplissage des capsules, en allofécondation par rapport à celui observé en pollinisation libre, augmente significativement. Pour la plupart des eucalyptus, le rapport entre le nombre de graines produites sur le nombre total d'ovules augmente de 2 à 6 fois entre les deux types de pollinisation (Sedgley et Smith 1989, Tibbits 1989, Moncur *et al.* 1995).

Tableau 40. Revue des études relatives aux flux de gènes - Partie 1 : Résultats sur les Gymnospermes

Espèces	Mode pollinisation	Type de peuplement	Taille parcelle (ha)	Nombre de géniteurs	Nombre d'individus et descendances	Type de descendants	Type de marqueur	Taux d'allogamie (%)	Taux de contamination (%)	Observations
<i>Cedrus atlantica</i> ⁴⁷	Anémophile	Naturel (90ha)	5	383 (90ha)	122 (5ha)	Régénération	Aflp +microsatellite chloroplastique	98		Distance de pollinisation > 600m
<i>Pinus abies</i> ²²	Anémophile	Verger	-	6 clones	60/6desc.	Embryons	Isoenzyme	95-98	10-17	
<i>Pinus abies</i> ⁴⁶	Anémophile	Verger	13,2	2877 (436 /ha) 1900 (218 /ha) Total	600-969 623-1044 1233-2013	Plantule	Isoenzyme	99 (96-100) - -	63 (55-68) 76 (70-81) 70	Les variations annuelles sont faibles
<i>Pinus flexilis</i> ¹¹	Anémophile	Naturel	15	371	518	Embryon	Isoenzyme		6,5	Distance pollinisation >800 m, 130 m moyenne Panmixie si 15 ha
<i>Pinus contorta</i> ³³	Anémophile	Verger	4,4	1758 (39 clones)	31-58/15 desc.	Embryons	Microsatellite chloroplastique	98	5	Forte variabilité du succès reproducteur des mâles
<i>Pinus pinaster</i> ²⁸	Anémophile	Verger	-	320	309	Plantule	Microsatellite chloroplastique	-	36 (19-76)	
<i>Pinus massoniana</i> ⁵	Anémophile	Verger	-	58	-	-	Isoenzyme		28 (21 contre 39 en périphérie)	
<i>Pinus sylvestris</i> ²⁰	Anémophile	Verger	16	34	340	Embryons	Isoenzyme	-	30	
<i>Pinus sylvestris</i> ²¹	Anémophile	Verger	12,5 16	39	3	Embryons	Isoenzyme	95,7 96,1	36 21	
<i>Pinus sylvestris</i> ²⁹	Anémophile	Naturel Verger	-	-	910 1567	Embryons	Isoenzyme	94 98	-	
<i>Pinus taeda</i> ²⁵	Anémophile	Verger (2)	2 2	301 (23 clones) 300 (27 clones)	100/36 desc.	Embryons	Isoenzyme	98,8	-	Pas de différence entre verger ni entre les 3 années de récolte
<i>Pinus thunbergii</i> ⁹	Anémophile	Verger		16 clones	96	Graines	Rapd	98	4	2 clones 50 % des descendants, 7 clones ne participent pas Pas de panmixie
<i>Pseudotsuga menziesii</i> ¹⁰	Anémophile	Verger (5)	-	480 (20 clones)	-	Graines	Microsatellite chloroplastique	94 (81-100)	40	
<i>Pseudotsuga menziesii</i> ²³	Anémophile	Verger	20	417 (25 clones)	200/an (4 récoltes)	Embryons	Isoenzyme	-	48 (42-61/an)	Pas de variation annuelle

Ces résultats s'expliquent de différentes manières. En croisement contrôlé, le stigmate est saturé en pollen ne provenant que d'un seul individu. En pollinisation libre, la fleur est susceptible de recevoir des quantités différentes de pollen d'origines diverses (autopollen, allopollen d'un ou plusieurs donneurs). Les mécanismes d'auto-incompatibilité et de compétition inter-pollinique conduisent à la diminution du rendement grainier (Mitchell 1997, Cowan *et al.* 2000, Quesada *et al.* 2001). En dehors des mécanismes pré-zygotiques, d'autres phénomènes sont mis en jeu après la fécondation. Pour *E. regnans*, Sedgley *et al.* (1989) ont suggéré l'existence d'interactions entre les embryons pour les ressources maternelles jusqu'à la maturité des graines. Moran et Brown (1980) ont fait l'hypothèse que les graines, à l'intérieur d'une même capsule, ne conservent pas forcément le même pouvoir germinatif suivant leur origine : allopollen ou autopollen.

En conclusion, nous pouvons considérer qu'*E. grandis* est bien adapté à la station et que les conditions environnementales sont favorables à son développement. Mais certains éléments, liés à la croissance et à la phénologie, sous l'influence de l'origine géographique ou des effets de la sélection et du voisinage probablement, laisseraient supposer l'existence de flux de pollen préférentiels conduisant à des déviations par rapport au modèle de la panmixie.

3.2 CONSEQUENCES DES FLUX DE GENES DANS LE VERGER

Le tableau 40 présente les caractéristiques et les résultats d'études antérieures réalisées chez les angiospermes ou chez les gymnospermes en matière de régime de reproduction. Les résultats présentés concernent les taux d'allogamie, les taux de pollinisation dans les vergers à graines et les distances de migration du pollen intra- et inter-populations. Les méthodologies, les marqueurs et les échantillons sont inévitablement différents. Toutefois, les résultats permettent de dégager quelques généralités que nous présenterons au fil de la discussion.

Avec les marqueurs enzymatiques, la démarche utilisée est basée principalement sur l'approche « allèle rare » ou sur l'approche multilocus qui prend en compte les différences de fréquences alléliques entre le verger et un échantillon de sa descendance (Friedman et Adams 1985a, Ritland et Jain 1981, El-Kassaby *et al.* 1989). Les études plus récentes reposent sur les marqueurs microsatellites associés à une analyse de paternité par exclusion génétique, approche toutefois développée à partir des marqueurs enzymatiques (Devlin et Ellstrand 1990, Adams 1992, Dow et Asley 1996, Streiff *et al.* 1999). Nos travaux confirment la pertinence des marqueurs microsatellites pour la recherche de paternité.

Tableau 40. Revue des études relatives aux flux de gènes - Partie 2 : Résultats sur les Angiospermes (sauf eucalyptus)

Espèces	Mode pollinisation	Type de peuplement	Taille parcelle (ha)	Nombre géniteurs	Nombre d'individus et descendances	Type de descendants	Type de marqueur	Taux d'allogamie (%)	Taux de contamination (%)	Observations
<i>Carapa guianensis</i> ²⁶	Inconnu	Naturel	-	15 arbres/ha	20/20 desc.	Embryons	Isoenzyme	97-99	-	-
<i>Carya illinoensis</i> ¹⁷	Anémophile	Verger	-	12	150	-	Isoenzyme	100	-	-
<i>Caryocar brasiliense</i> ¹⁵	Entomophile	Naturel	30	-	600	Graines 40 descendances	Microsatellites	100	-	-
<i>Cecropia obtusifolia</i> ¹⁴	Anémophile	Naturel	8,6	47 mâles 41 femelles	1200	30 descendances graines	Isoenzyme	-	37	Distance de pollinisation importante
<i>Cordia alliodora</i> ³⁵	Entomophile	Naturel	6	123	50 desc.	Plantule	Isoenzyme	97 (40-100)	-	Variation annuelle du taux d'allogamie
<i>Dinizia excelsa</i> ⁸	Entomophile	-	-	-	-	-	Microsatellite	-	-	Distance de pollinisation maximale de 3,2 km
<i>Dryobalanops aromatica</i> ¹⁹	Entomophile	Naturel Naturel exploité Plantation Verger à graines	- - 200 2 ha	15 arbres/ha 7 arbres/ha 16 arbres/ha 20 arbres/ha	35 à 40 embryons par arbre-mères	Embryons	Isoenzyme	92 77 66 55	-	Développement floral perturbé, problème de synchronisme, population de pollinisateurs insuffisante
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> ³⁴	Entomophile	Naturel exploité	10	11	50/5 desc. (3 récoltes)	Plantules	Isoenzyme	-	72	Grand nombre de géniteurs mâles par femelle
<i>Magnolia obovata</i> ⁷	Entomophile	Naturel	69	83	91	Régénération	Microsatellite	-	40	Distance de 540 m par le pollen et de 264m par les graines
<i>Metrosideros excelsa</i> ²⁷	Oiseaux	Naturel	-	150-200	15/15 desc.	Plantules	Isoenzyme	22-53	-	-
<i>Neobalanocarpus heimii</i> ¹²	Entomophile	Naturel	42	30	250	Jeune semis Régénération	Aflp	90 100	28	19/30 pères participant 500 m
<i>Pithecellobium elegans</i> ⁴	-	Naturel dégradée	-	28	-	Descendances	Microsatellite	-	29	Déséquilibre :142 identifiés dont 10 pères dominants
<i>Quercus macrocarpa</i> ¹	Anémophile	Naturel	5	62	94 sapling	Régénération naturelle	Microsatellite	100	66	29% mères 25% pères
<i>Quercus macrocarpa</i> ¹⁵	-	-	-	62	282	3 descendances	Microsatellite	100	62	Pas d'effet distance, 38 pères 75 m en moyenne
<i>Quercus robur</i> ⁶	Anémophile	Verger	-	-	180/3 desc.	Plantules	Microsatellite	100	70	Croisements préférentiels
<i>Quercus robur</i> et <i>Q. petraea</i> ²	Anémophile	Naturel	5,8	296	984/13 desc.	Plantules	Microsatellite	95	65 69	1-15 desc/père Effet distance et direction significatif
<i>Rhododendron metternichii</i> ³¹	Entomophile	Naturel	1	18	216/5 fruits	Plantules	Microsatellite	-	20-30	Composition paternelle très variable d'un arbre à l'autre
<i>Sorbus terminalis</i> ¹⁸	-	Naturel	-	169	20- 100/15desc.	Plantules	Microsatellite	-	43	36% pollen émis à plus d'un kilomètre
<i>Vouacapoua americana</i> ⁵	Entomophile	Naturel	-	Estimation par F_{ST}	-	-	Microsatellite	-	-	> 100 m Faible dispersion des graines
<i>Zwittenia humilis</i> ¹⁶	Entomophile	Naturel dégradé	-	180	34 desc.	Plantules	Microsatellite	-	-	Grandes distances de pollinisation

3.2.1 Régime de reproduction

Nous avons montré qu'*E. grandis* présente un régime de reproduction mixte à dominante allogame. C'est une caractéristique générale des eucalyptus (Moran 1992). Les résultats en pollinisation libre, que nous avons présentés, sont intermédiaires entre la production en autofécondation et en allofécondation stricte. Toutefois, ils suggèrent un taux d'allogamie important dans le verger. La littérature indique plusieurs résultats similaires que ce soit sur *E. grandis* (Hogdson 1976a), *E. regnans* (Eldridge et Griffin 1983) ou sur *E. globulus* (Hardner et Potts 1995).

Le taux d'autofécondation, estimé à 3%, est équivalent, voir inférieur, à ce qui est observé dans les peuplements artificiels et plus spécifiquement dans les vergers à graines (Moran et Brown 1980, Yeh et al. 1983). Chez les eucalyptus, la synthèse des résultats dans ce domaine, présentée en introduction, montre que la contre-sélection envers les individus autofécondés s'exprime à différents niveaux depuis la fécondation jusqu'à la croissance au champ. Ses effets principaux conduisent à la diminution du nombre de fruits produits, du remplissage des capsules et à l'augmentation du taux de plantules anormales. Nous discuterons, plus loin, des implications de ces éléments.

Le taux élevé d'allofécondation dans le verger est certainement la conséquence de plusieurs facteurs. En dehors de la variabilité phénologique observée au cours du temps, les arbres fleurissent en masse sur une période déterminée. Ceci augmente la concentration en insectes et favorise la pollinisation et probablement l'allogamie. Le dispositif de ces parcelles est élaboré et conduit dans le but d'obtenir un peuplement équienné, correspondant à un ensemble d'individus de taille homogène. En conséquence, nous pouvons considérer que les éclaircies sélectives, conduisant à homogénéiser le phénotype des arbres, contribuent indirectement à favoriser l'allogamie et le brassage génétique. Au niveau individuel, la présence simultanée d'un grand nombre d'arbres en fleur augmente le rapport entre allopollen et autopollen et ce d'autant que la densité d'arbre est élevée. Dans ce cas, pour les pollinisateurs qui dans un souci d'efficacité recherchent à limiter leurs déplacements, le coût ces derniers entre deux individus est équivalent à ce qu'il est sur un seul arbre. En revanche, si les distances entre les individus sont plus importantes, les insectes restent préférentiellement sur la source et l'exploitent au maximum en favorisant l'autogamie (House 1997).

Tableau 40. Revue des études relatives aux flux de gènes - Partie 3 : Résultats sur les eucalyptus

Espèces	Mode pollinisation	Type de peuplement	Taille parcelle (ha)	Nombre géniteurs	Nombre d'individus et descendances	Type de descendants	Type de marqueur	Taux d'allogamie (%)	Taux de contamination (%)	Observations
<i>Eucalyptus delegatensis</i> ³²	Entomophile	Naturel	-	-	10/30 (3 récoltes)	Plantules	Isoenzyme	66-85	-	Contre-sélection des individus auto-fécondés durant la maturation des graines
<i>Eucalyptus globulus</i> ³⁰	Entomophile	Naturel fermé Naturel ouvert Arbre isolé	-	-	8 desc.	Plantules	Isoenzyme	99 75 50	-	-
<i>Eucalyptus globulus</i> ⁴⁴	Entomophile			2 populations	13 desc.	Adulte	-	69	-	Taux d'allogamie estimé à partir de la comparaison des caractères de croissance en auto- et en allofécondation
<i>Eucalyptus grandis</i> ²⁴	Entomophile	Verger	-	-	40	Plantules	Isoenzyme	87	-	Taux de consanguinité de 0,07
<i>Eucalyptus leucocylon</i> ⁴⁰	Entomophile, oiseaux	Plantation	100	1000	20 desc.	Plantules	Isoenzyme	82		
<i>Eucalyptus marginata</i> ³⁷	Entomophile	Naturel		4 populations	18/40 desc.	Plantules	Isoenzyme	71, 80, 81, 92	-	
<i>Eucalyptus pellita</i> ³⁹		Naturel		3 populations	5/27 desc.	Plantules	Isoenzyme	45, 49, 73	-	
<i>Eucalyptus pulverulenta</i> ³⁸		Naturel		3 populations	20/44 desc.	Plantules	Isoenzyme	48, 65, 98	-	Aire naturelle disjointe
<i>Eucalyptus rameliana</i> ³⁶	Oiseaux	Naturel	-	4 populations	15-20/54 desc.	Plantules	Isoenzyme	54, 86, 95, 96	-	1 population avec peu de pollinisateurs
<i>Eucalyptus regnans</i> ³²	Entomophile	Naturel Verger	- 2,4	41 10	10/41 desc. 20/81 desc.	Plantules Plantules	Isoenzyme	73 91	-	-
<i>Eucalyptus regnans</i> ⁴⁵	Entomophile	Naturel		2 populations		Arbre adulte	Isoenzyme	81		Forte variation individuelle
<i>Eucalyptus regnans</i> ⁴³	Entomophile	Naturel		2 populations	13 desc.		-	56 à la plantation 83 à 15 ans		Estimation / caractères de croissance en auto- et allofécondation
<i>Eucalyptus urophylla</i> ⁴¹	Entomophile	Plantation		121	24/11 desc.	Plantules	Rapd Aflp	93 89		

On entend par taux de contamination dans les peuplements naturels, le taux de pollen venant de l'extérieur par rapport à l'échantillon d'étude, ce terme n'a pas forcément la même signification pour les vergers à graines
 1 : Dow et Ashley 1996, 2 : Streiff *et al.* 1999, 3 : Dutech *et al.* 2002, 4 : Chase *et al.* 1996, 5 : Huanlin et Tianhua 1997, 6 : Buiteveld 2001, 7 : Isagi *et al.* 2000, 8 : Dick 2001, 9 : Goto *et al.* 2002, 10 : Stoehr *et al.* 1998, 11 : Schuster et Mitton 2000, 12 : Konuma *et al.* 2000, 13 : Dow et Ashley 1998, 14 : Kaufman *et al.* 1999, 15 : Collevatti *et al.* 2001, 16 : White *et al.* 2002, 17 : Rüter *et al.* 2000, 18 : Oddou-Muratorio *et al.* 2001, 19 : Lee 2000, 20 : Wang *et al.* 1991, 21 : El-Kassaby *et al.* 1989, 22 : Paule *et al.* 1993, 23 : Adams *et al.* 1997, 24 : Sato et Mori 1996, 25 : Friedman et Adams 1985b, 26 : Hall *et al.* 1994, 27 : Schmidt-Adam *et al.* 2000, 28 : Plomion *et al.* 2001, 29 : Muona et Harju 1989, 30 : Hardner *et al.* 1996, 31 : Kamemaya *et al.* 2000, 32 : Moran et Brown 1980, 33 : Stoehr et Newton 2002, 34 : Apsit *et al.* 2001, 35 : Boshier *et al.* 1995, 36 : Sampson *et al.* 1995, 37 : Millar *et al.* 2000, 38 : Peters *et al.* 1990, 39 : House et Bell 1996, 40 : Ellis et Sedgley 1993, 41 : Gaiotto *et al.* 1997, 42 : Griffin *et al.* 1987, 43 : Hardner et Potts 1997, 44 : Griffin et Cotteril 1988, 45 : Moran *et al.* 1989, 46 : Pakkanen *et al.* 2000, 47 : Lourmas 2001

3.2.2 Contributions des géniteurs au nuage pollinique

Nous avons montré, sur trois années, que la dynamique de floraison était stable d'une année à l'autre. Malgré l'absence d'observations sur la floraison de 1997 qui concernent les descendances étudiées, nous pouvons confronter les résultats d'analyse de paternité avec ceux de la phénologie.

La composition du nuage pollinique des arbre-mères, qu'il soit potentiel (basé sur les observations phénologiques) ou observé, diffère d'un arbre à l'autre. Mais, en définitive, plus de la moitié des géniteurs contribue au nuage pollinique observé à partir de 724 individus issus des 30 arbre-mères. Le maintien de la diversité allélique entre les deux générations est en relation directe avec le brassage observé. Pour la plupart des arbres-mères, le nombre de géniteurs mâles est proche du nombre de descendants. En d'autres termes, les contributions individuelles paternelles diffèrent peu et, à quelques exceptions près, nous n'avons pas observé de déséquilibre important dans la constitution du nuage pollinique. Pourtant, le verger à graines est constitué par du matériel génétique peu ou pas domestiqué présentant une forte variabilité des caractères de croissance et de phénologie. Dans ce cas, nous aurions pu nous attendre à des biais relativement plus importants remettant en question le schéma d'amélioration retenu. Les contributions relatives des provenances et de certaines familles du verger diffèrent sensiblement, probablement, à cause de la proportion plus importante, dans notre échantillon, d'arbre-mères de la provenance d'Andranokobaka. Nous avons vu, pour ces géniteurs, que les probabilités de croisement intra provenance étaient plus élevées en début de saison et inversement pour d'autres en fin de saison.

La randomisation géographique des géotypes dans le verger et l'activité des insectes pollinisateurs ont des conséquences majeures sur le brassage génétique observé. L'origine du pollen semble géographiquement aléatoire et il n'y a pas de croisements préférentiels entre voisins. Il serait intéressant d'effectuer un contrôle dans un essai basé sur des parcelles unitaires en placeau où les plus proches voisins sont apparentés. La proximité des houppiers, l'architecture des fleurs, le caractère collant du pollen des eucalyptus à son émission et les échanges de pollen à l'intérieur des ruches conduisent, probablement, à ce que les insectes déplacent, simultanément, des pollens d'origines paternelles diverses. Vaissière *et al.* (1996) ont fait l'hypothèse, sur des espèces entomophiles, qu'une part du pollen pouvait atteindre les stigmates par voie aérienne du seul fait du pollen émis dans l'air par les insectes pendant leur déplacement.

Les espèces anémophiles, comme les pins et les chênes, présentent des flux de gènes élevés et des distances de pollinisation importantes. Les flux de gènes, chez les angiospermes, dépendent du vecteur de pollinisation. Nous constatons que les abeilles domestiques, souvent le principal pollinisateur décrit, conduisent à des flux de pollen élevés et à des déplacements sur de longues distances.

3.2.3 Taux de contamination pollinique

La part, dans la descendance, du pollen extérieur au verger est de 39% et nous n'avons pas observé de relation entre les taux individuels de contamination et la position des arbres dans le verger. Ces flux de pollen ont un impact important sur l'efficacité de la stratégie d'amélioration au moyen de vergers à graines. La contamination pollinique compromet la qualité et la stabilité de la variété produite. Avec une contamination pollinique de 100%, les gains génétiques attendus sont diminués d'au moins 50%. Ils le sont encore plus fortement si la contamination provient d'individus mal adaptés.

Les dimensions du verger sont, sans aucun doute, à mettre en cause car les distances de pollinisation observées sont équivalentes aux distances potentielles compte tenu de la taille de la parcelle. La première précaution consiste à isoler au mieux les vergers à graines, mais notre expérience montre que les distances de pollinisation pouvaient être importantes et que les eucalyptus sont omniprésents à Madagascar. Par rapport au type de dispositif, lié à notre stratégie d'amélioration et pour des raisons évidentes d'efficacité de la sélection, il n'est pas envisageable de produire les variétés en dehors des zones d'utilisation. Il s'agit donc de sélectionner les individus en fonction de leur phénotype et de leur croissance, l'ensemble étant, en partie, l'expression des valeurs génétiques dans un environnement donné. A moins d'utiliser des vergers à graines de clones sélectionnés, nous pourrions installer ces vergers dans les zones où les eucalyptus sont plus rares. Les efforts pour isoler au mieux les vergers à graines de la contamination pollinique n'ont pas donné de résultats probants et nous allons voir qu'ils sont souvent importants.

Les études sur les vergers à graines ont essentiellement concerné les espèces résineuses anémophiles avec les marqueurs isozymes. Les taux de contamination varient de 5 à 80% selon les espèces et les vergers, mais ils sont globalement élevés. Stoehr et Newton (2002), dans un verger à graines de *Pinus contorta*, annoncent un taux de 5%. En revanche, Adams *et al.* (1997), sur

le même type de parcelle, mais pour *Pseudotsuga menziesii*, ont obtenu des taux de contamination annuels compris entre 42 et 61%. Ces mêmes auteurs n'ont pas observé de variation inter annuelle significative malgré l'accroissement de la production de pollen lié avec l'âge du verger. Buiteveld *et al.* (2001), dans un verger à graines de clones de chêne pédonculé, observent un taux de pollution de 70%. En peuplements naturels, même si l'on ne peut pas parler de pollution pollinique, la plupart des travaux montre que les distances de pollinisation sont importantes que ce soit pour les espèces anémophiles ou entomophiles. Dans un verger d'*E. nitens*, Grosser *et al.* (2001) ont estimé un taux de contamination pollinique de 5% mais aucun détail sur la parcelle d'étude ni sa localisation n'ont été fournis. Néanmoins, les recherches menées pour simplifier et diminuer les coûts de production en matière de croisements contrôlés (Harbard *et al.* 1999, Williams *et al.* 1999) laissent suggérer que les problèmes de pollution pollinique sont réels. En définitive, les auteurs s'accordent pour dire que les valeurs de pollution pollinique peuvent atteindre des valeurs élevées, quel que soit le vecteur de pollinisation, et que les flux de gènes observés peuvent correspondre à des distances de pollinisation importantes.

Dans notre cas, l'hypothèse la plus vraisemblable est celle de la contamination pollinique par *E. robusta*, l'espèce est la plus représentée dans la zone du verger. Les travaux de pollinisation contrôlée ont montré que le pollen de cette espèce pouvait féconder les fleurs d'*E. grandis* et conduire à la production d'individus hybrides. Les fleurs d'*E. robusta* sont 4 à 5 fois plus grosses et l'espèce n'est pas classée comme mellifère. Probablement, les insectes pollinisateurs sont différents pour ces deux espèces. Cependant, la gamme et les fréquences alléliques du nuage pollinique externe sont similaires à celles de la population parentale. Si les marqueurs microsatellites ont la particularité d'être développés pour une espèce et d'être potentiellement transférés vers d'autres (Byrne *et al.* 1996, Streiff *et al.* 1998, Rosseto *et al.* 2000), nous avons constaté qu'il est généralement nécessaire de modifier le protocole d'amplification ou de révélation. Or, nous n'avons rencontré aucun problème de révélation. D'autre part, la morphologie des individus issus de paternité externe est très semblable à celle des individus issus du verger et aucun caractère hybride n'a été observé. Nous pouvons conclure au fait que sur notre échantillon de descendants nous ne mettons pas en évidence de parenté liée à *E. robusta*. Pour confirmer notre argumentation, il faudrait « génotyper », avec les mêmes marqueurs, une population représentative d'*E. robusta*. Ce qui nous permettrait de contrôler la qualité des amplifications et dans l'affirmative de comparer la variabilité allélique de cette espèce avec celle du verger d'*E. grandis*.

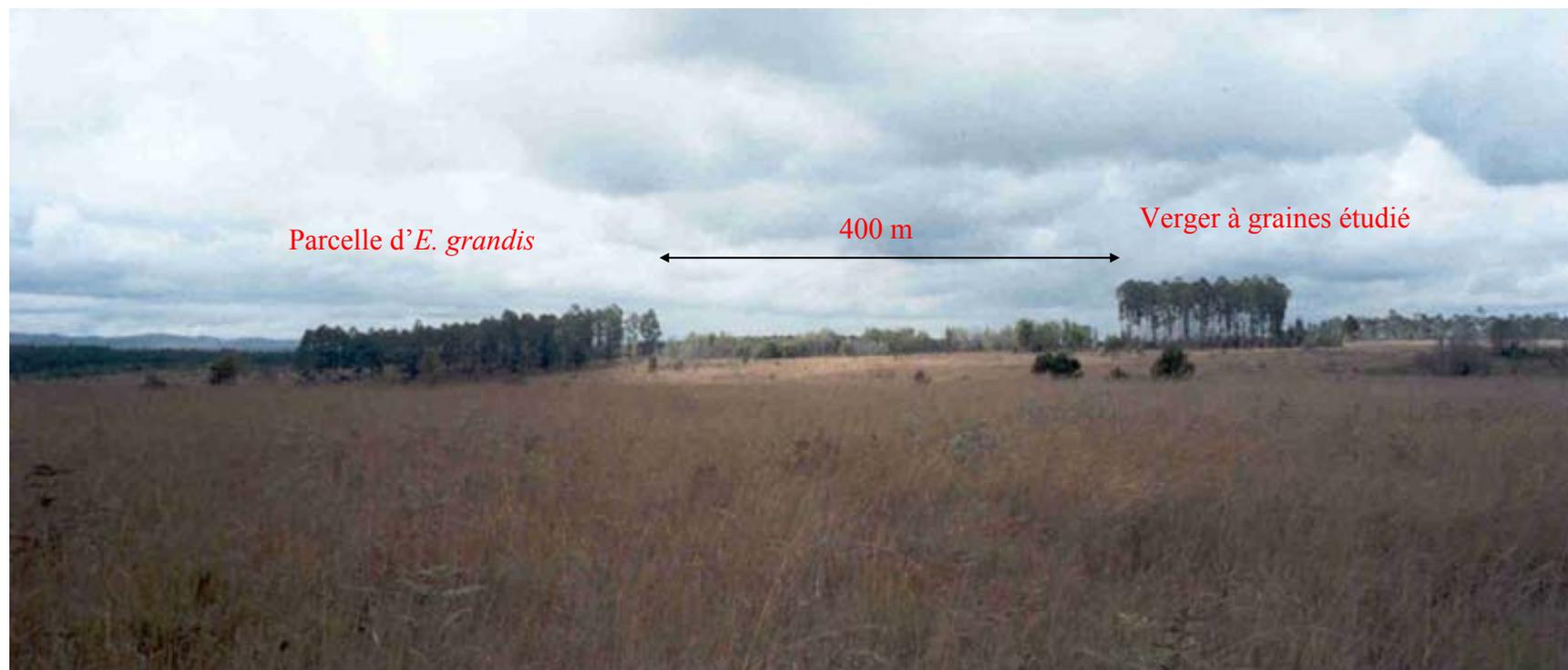


Figure 51. Vue partielle de la zone du verger à graines

Compte tenu de ces éléments, nous suggérons que le pollen externe provient de la parcelle d'*E. grandis* voisine située à 400 mètres (figure 51), qui est constituée par 12 familles originaires de 4 provenances (Andranokobaka, Atherton, Ravenshoe et Paluma), dont 6 sont communes avec le verger. En conséquence, il y a de forte chance pour que la floraison de cette parcelle soit simultanée et que les insectes pollinisateurs soient les mêmes. Enfin, la diversité allélique du nuage pollinique exogène suggère que le nombre d'individus y contribuant est probablement équivalent à celui que nous avons estimé dans le nuage pollinique interne.

4. CONCLUSIONS

L'ensemble des éléments que nous venons de discuter nous permet de suggérer, en faisant un certain nombre d'hypothèses, que le régime de reproduction du verger est favorable au brassage génétique et qu'il tend vers le modèle théorique de la panmixie. Nous allons décrire dans cette partie les différentes implications que nous pouvons tirer de notre réflexion.

4.1 APPLICATIONS DIRECTES DES RESULTATS

4.1.1 Sur le programme d'amélioration

Notre échantillon de descendants est le résultat des croisements entre les 30 géniteurs femelles et les 197 géniteurs mâles, sur un total de 349 individus, contribuant individuellement peu et de façon équilibrée. Dans chaque descendance, la proportion entre le nombre de plein-frères et d'individus autofécondés par rapport aux individus issu d'allofécondation strictes est faible. Dans ces conditions, la descendance du verger est constituée principalement par des familles de demi-frères et nous pouvons considérer comme valides les modèles classiques de génétique quantitative adaptés aux descendance de demi-frères.

La diversité du nuage pollinique suggère l'inexistence ou de faibles niveaux d'incompatibilité entre les géniteurs quelle que soit leur origine. En conséquence, un arbre donné dans le verger est pollinisé par un nuage pollinique constitué par un nombre important de donneurs correspondant à un « polymix » (Plomion *et al* 2001, Lambeth *et al.* 2001). Dans ce contexte, nous devrions améliorer l'estimation des aptitudes à la combinaison des géniteurs et des héritabilités en augmentant les effectifs des descendance de demi-frères.

4.1.2 Sur la qualité et la stabilité de la variété produite

La sélection effectuée dans la parcelle, le taux élevé de floraison et la présence d'une population importante d'abeille domestique expliquent, en grande partie, les caractéristiques observées du brassage dans le verger. En raison de la stabilité de la floraison, celles-ci varient probablement peu d'une année sur l'autre. En conséquence, nous pouvons estimer que la valeur de la variété produite est potentiellement stable d'une saison à une autre.

Les individus autofécondés subissent les effets de la dépression consanguine qui se manifestent par une croissance significativement plus faible par rapport aux descendants des croisements demi-frères et plus encore par rapport aux individus issus d'allofécondation stricte. Nous pouvons considérer, sans aucune sélection volontaire, que les individus autofécondés, en faible fréquence dans les descendances, n'altèrent en rien la valeur de la variété. En effet, dans les conditions habituelles de plantation, s'ils ne sont pas éliminés par les tris successifs en pépinière volontairement ou non, ces arbres sont rapidement dominés sans pour autant altérer la production de la parcelle, l'espace libéré étant rapidement occupé par les plus proches voisins. Dans ce contexte, ces arbres ont de forte chance de dépérir ou d'être peu représentatifs dans la constitution du nuage pollinique s'ils atteignent l'âge de maturité sexuelle. Quand bien même ils participeraient à la reproduction, l'hétérozygotie serait restaurée dès la génération suivante, mais ils contribueraient à augmenter, dans la population, la fréquence des allèles délétères.

Les descendants de croisement entre demi-frères renferment probablement une proportion d'individus de croisement entre pleins-frères. Ils sont en proportion non négligeable dans la descendance du verger mais leur croissance n'est pas significativement affectée et la qualité de la variété n'est donc pas influencée. Néanmoins, au fil des générations, ces individus contribuent à augmenter le taux de consanguinité dans la population. En conséquence, comme le schéma d'amélioration le permet, nous insistons sur l'importance du brassage au cycle d'amélioration suivant entre les différentes populations produites par les vergers d'une même espèce.

4.2 PROPOSITIONS POUR UNE MEILLEURE GESTION DES VERGERS A GRAINES

4.2.1 Précautions pour les récoltes de graines

La variabilité de la phénologie à l'intérieur du verger explique, en grande partie, les résultats de notre étude. Nous avons confirmé, avec l'appui de l'analyse de paternité basée sur les marqueurs microsatellites, nos hypothèses par rapport à la qualité de la reproduction du verger. Ceci conduit à plusieurs suggestions pratiques sur la méthodologie à appliquer pour la récolte de graines dans le verger.

- Les assemblages de plusieurs années de production ne sont pas nécessaires. En faisant l'hypothèse que la durée de maturation des fruits est la même pour tous les arbres et qu'elle dépend essentiellement des conditions bioclimatiques, la floraison régulière et établie d'*E. grandis* dans la région permet de récolter le verger en une seule opération. Le brassage observé montre qu'il n'est pas nécessaire d'effectuer des assemblages de plusieurs années de production comme nous aurions pu le suggérer avant cette étude. Si ces observations sont vérifiées, pour l'ensemble des espèces concernées, le tout contribue à faire des économies, non négligeables, de gestion, de stockage et à diminuer les risques d'erreur d'étiquetage, d'identification, *etc.*

- Effectuer des pesées de capsules et poursuivre les tests de germination. Dans l'échantillon étudié, la variabilité du nombre de capsules par kilogramme s'explique par les effets de la structuration de la population parentale. Celle-ci dépend de l'origine géographique des provenances et particulièrement au comportement des provenances d'Andranokobaka et d'Atherton. Cette variabilité n'est pas sans conséquence quand il s'agit d'établir des règles simples pour constituer les variétés à partir des différents lots récoltés. En dehors de la provenance Paluma qui pose un problème général et qui devrait être éliminée du verger, le nombre de graines viables par kilogramme de capsules varie peu. En conséquence, la simple pesée des capsules avec les résultats des tests de germination habituellement effectués, permettraient d'équilibrer les contributions maternelles pour la constitution de la variété.

- Effectuer une récolte sélective des arbres en fonction de leur phénologie. Nous recommandons aussi de généraliser, sur l'ensemble des vergers malgaches, les observations individuelles de la phénologie sur une durée de 2-3 ans. Cette opération ne demande pas de lourds investissements dans la mesure où une équipe est basée en permanence sur les sites de production. L'objectif est de déterminer la variabilité intra-spécifique de la floraison, que ce soit

au niveau individuel, au niveau familial ou au niveau de l'origine géographique. Ceci conduisant, avant récolte, au classement des arbres selon qu'ils fleurissent marginalement (groupe 1), sur toute la saison (groupe 2) ou plus spécifiquement durant le pic de floraison du verger (groupe 3). Dans cette configuration, seuls les individus du troisième groupe sont récoltés pour constituer la variété. Ceux du premier groupe seront éliminés lors de la première éclaircie. Ceux du deuxième groupe ne seront pas récoltés car ils sont susceptibles de capter plus de pollen externe en période marginale mais ils contribuent, cependant, à la génération suivante en tant que géniteurs mâles et ils permettent de densifier le peuplement.

- Appui du laboratoire de biologie moléculaire local. La mise en place prochaine d'un laboratoire de biologie moléculaire à Madagascar nous permettra de vérifier certaines des hypothèses que nous avons faites. Il s'agit de venir en appui aux observations phénologiques par l'estimation du brassage génétique dans un verger quelconque. Le nombre de marqueurs microsatellites développés pour les eucalyptus, plus spécifiquement sur *E. grandis* et *E. urophylla*, est en nette progression (Nest 2000, Steane *et al.* 2001, Brondani *et al.* 2002). Au préalable, il convient d'adapter quelques-uns de ces marqueurs aux espèces concernées. Ensuite, la procédure consisterait à récolter deux à trois descendances dans les vergers et à acquérir, sur une cinquantaine de demi-frères, les données moléculaires pour un ou plusieurs locus retenus pour leurs niveaux de polymorphisme spécifique à l'espèce. Nous obtiendrons une indication, sommaire mais certainement suffisante, du brassage dans le verger par le nombre d'allèles paternels observés par famille et pourrons généraliser, ou non, nos résultats à une partie ou à l'ensemble du dispositif.

4.2.2 Méthodes pour limiter le taux de contamination pollinique

L'interprétation de nos résultats montre que le nuage pollinique externe provient de la parcelle d'*E. grandis* voisine. Pourtant, la parcelle la plus proche est constituée par *E. robusta* et cette espèce est omniprésente dans la zone d'étude. En d'autres termes, les probabilités de contamination pollinique par cette espèce sont plus élevées. Ceci voudrait dire que le brassage dans un verger d'*E. grandis*, en pollinisation libre, n'est pas forcément perturbé par la présence de l'*E. robusta*, compatible avec *E. grandis*, pourtant abondant dans le voisinage. Si les hypothèses émises précédemment sont levées, nous pourrions conclure, au moins pour ces deux espèces, que la proximité entre deux vergers n'est pas forcément source de flux géniques interspécifiques. Dans ce cas, les règles de mise en place des vergers dans les zones de production grainières pourront

être simplifiées et conduiront à faciliter la gestion de l'espace. Dans le cas inverse plusieurs options sont proposées :

- Éliminer le verger contaminant. Dans ce cas, ne risque-t-on pas de favoriser l'apparition d'autres sources de pollen externe ?

- Installer des vergers de tailles plus importantes en désignant une zone centrale de récolte et une zone tampon. La constitution et la gestion devront être homogènes sur l'ensemble, entraînant des besoins en matériel végétal et des coûts plus élevés pour une production qui ne sera pas forcément améliorées car les distances de pollinisation sont élevées.

- Délocaliser la production de graines sur d'autres sites. Le choix des provenances basé sur les conditions écologiques et climatiques de la zone de plantation conduit à une adaptation globalement bonne des différentes populations. La délocalisation des vergers à graines s'accompagne de nouvelles contraintes liées aux interactions génotype-environnements, qu'il s'agisse, par exemple, de l'absence de certains pollinisateurs, de l'effet de la température sur les cycles phénologiques, sur la durée de maturation des graines, de problèmes phytosanitaires, *etc.*

- Effectuer des plantations, avec une espèce non compatible, dans la périphérie des vergers. Cette opération augmenterait considérablement les coûts de production. D'une manière plus réaliste, si plusieurs essences sont concernées et adaptées à telle ou telle condition bioclimatique, il s'agirait de planter une mosaïque de verger pour des espèces ne s'hybridant pas entre elles. Ceci suggère l'existence et la disponibilité de terrains suffisamment grands et homogènes. Néanmoins, il faut avoir les informations préalables sur les périodes respectives de floraison. L'occurrence des espèces dans l'aire naturelle conduit à des décalages phénologiques sous contrôle génétique qui ont de forte probabilité pour se reproduire en zone d'introduction.

- Effectuer des croisements contrôlés et adapter les nouvelles techniques de pollinisation mises au point. Effectuer le tri des plants avant la plantation sur la base de leur données moléculaires et des résultats d'analyse de paternité. Compte tenu des coûts de ce genre d'opération et des résultats parfois décevants des croisements contrôlés, ces options ne sont pas généralisables à la production en masse. Toutefois, les croisements contrôlés peuvent s'envisager pour la production de population d'amélioration de génération suivante.

4.3 CONCLUSIONS SUR L'USAGE DES VERGERS A GRAINES A MADAGASCAR

Pour conclure, les vergers à graines en pollinisation libre constituent un outil classiquement utilisé en amélioration génétique. Ils permettent de conduire simultanément plusieurs objectifs et donc de minimiser les coûts liés à la conduite des programmes d'amélioration des espèces forestières. En dépit de l'importance de la croissance des eucalyptus, les cycles d'amélioration sont longs et ils nécessitent de mobiliser du terrain sur des périodes importantes et d'assurer un entretien minimum destiné à assurer leur pérennité dans un environnement difficile et peu contrôlé.

A Madagascar, les différents dispositifs élaborés pour les vergers à graines aboutissent, en fin de sélection, au cas de figure illustré par le verger à graines étudié, à la différence près que la surface des vergers se situe entre 1 et 4 hectares. A condition de limiter la pollution pollinique, et en respectant nos recommandations pour la sélection des porte-graines, cette étude montre que ce genre de dispositif est particulièrement adapté pour la production, à moindre coût, de semences améliorées sans avoir besoin d'intervenir au moment de la pollinisation. En conséquence, l'ensemble des résultats permet, avec quelques informations complémentaires à recueillir, d'asseoir les choix retenus pour la stratégie d'amélioration menée à Madagascar sans avoir recours, à nouveau, à de lourdes approches basées sur les marqueurs moléculaires qui ne sont pas encore utilisés en routine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bibliographie

1. Adams WT (1992). Gene dispersal within forest tree populations. *New Forests*, 6 : 217-240.
2. Adams WT, Birkes (1991). Estimating mating patterns in forest tree population. *Biochemical markers in the population genetics of forest trees*, (eds) Fineshi S, Mavolti ME, Cannata F, Hattemer HH, . Academic publishing, The Hague, Netherlands : 157-172.
3. Adams WT, Griffin AR, Moran GF (1992). Using paternity analysis to measure effective pollen dispersal in plant populations. *American Naturalist*, 140: 762-780.
4. Adams WT, Hipkins VD, Burczyk J, Randall WK (1997). Pollen contamination trends in a maturing Douglas-fir seed orchard. *Canadian Journal of Forest Research*, 27 : 131-134.
5. Anderson G, Hill JC (2002). Many to flower, few to fruit: the reproductive biology of *Hamamelis virginiana* (*Hamamelidaceae*). *American Journal of Botany*, 89 : 67-78.
6. Apsit VJ, Hamrick JL, Nason JD (2001). Breeding population size of a fragmented population of a costa rican dry forest tree species. *The Journal of Heredity*, 92 : 415-420.
7. Beardsell DV, O'Brien SP, William EG, Knox RB, Calder DM (1993) Reproductive biology of Australian *Myrtaceae*. *Australian Journal of Botany*, 41 : 511-526.
8. Becker J, Heun M (1995). Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology*, 27 : 835-845.
9. Bérenger E (2000). Les AGM : un nouveau risque pour les forêts. *Biofutur*, 1999 : 19-21.
10. Bertrand A (1992). Approvisionnement en combustibles ligneux d'Antananarivo et Mahajanga. Ministère de l'Energie et des Mines, UPED, 97 p.
11. Bertrand A (1999). La dynamique séculaire des plantations d'eucalyptus sur les Hautes Terres malgaches. *Le Flamboyant – Spécial eucalyptus*, 49 : 45-48.
12. Bigot Y, Rakotondrasata MF, Razafindraibe R (1992). L'installation d'un réseau d'observations par placette dans les plantations familiales. Fofifa, Antananarivo, Madagascar : 47p.
13. Boland DJ, Martensz PN (1981). Seed losses in fruits on trees of *Eucalyptus delegatensis*. *Australian Forestry*, 44 : 64-67.
14. Boland DJ, Sedgley M (1986). Stigma and style morphology in relation to taxonomy and breeding systems in *Eucalyptus* and *Angophora* (*Myrtaceae*). *Australian Journal of Botany*, 34 : 569-584.
15. Boland DJ, Brooker MIH, Turnbull JW (1987). *Eucalyptus* seed. Csiro, Canberra, Australia, 183p.
16. Boshier DH, Chase MR, Bawa KS (1995). Population genetics of *Cordia alliodora* (*Boraginaceae*), a neotropical tree – 2. Mating system. *American Journal of Botany*, 82 : 476-483.
17. Bouvet JM (1982). Pollinisation contrôlée des eucalyptus et production d'hybrides en république populaire du Congo. Mémoire de fin d'étude de l'école nationale des ingénieurs des travaux des eaux et forêts, Centre Technique Forestier Tropical - Centre du Congo, 126p.
18. Bouvet JM & Rakotonjanahary J (1988). Note de mise en place des essais pour la campagne 1987-88. Note FOFIFA-DRFP Antananarivo, 25p.
19. Bouvet JM, Andrianirina G (1990). *Eucalyptus grandis* in Madagascar: potential, assessment, and trends in research into genetic improvement. *Bois et Forêts des Tropiques*, 226 : 5-19.
20. Bouvet JM (1995). Evolution de la variabilité avec l'âge et corrélation juvénile-adulte dans les populations d'*Eucalyptus*. Thèse Institut National Agronomique Paris-Grignon, 236 p.
21. Bouvet JM (1999). Les plantations d'eucalyptus : évolutions récentes et perspectives. *Le Flamboyant – Spécial eucalyptus*, 49 : 4-14.
22. Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, Grattapaglia D (1998). Development characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 : 816-827
23. Brondani RPV, Brondani C, Grattapaglia D (2002). Towards a genus-wide reference linkage map for eucalyptus based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Molecular Genetics Genomic*, 267 : 338-347.
24. Brown ADH, Barrett SCH, Moran GF (1985). Mating system estimation in forest trees: models, methods and meaning. *Population Genetics in Forestry*. G. HR. Berlin, Springer : 22-49.
25. Buiteveld J, Bakker EG, Bovenschen J, Vries SMG de (2001). Paternity analysis in a seed orchard of *Quercus robur* L. and estimation of the amount of background using microsatellite markers. *Forest Genetics*, 8 : 331-337.
26. Burgess IP, Williams ER, Bell JC, Hardwood CE, Owens JV (1996). The effect of outcrossing rate on the growth of selected families of *Eucalyptus grandis*. *Silvae Genetica*, 45 : 2-3
27. Burrows GE (1995). Seed production in white box (*Eucalyptus albens*) in the South West Slopes Region of New South Wales. *Australian Forestry*, 58 : 107-109.

28. Burrows GE (2000). Seed production in woodland and isolated trees of *Eucalyptus melliodora* (yellow box, *Myrtaceae*) in the south western slopes of New South Wales. *Australian Journal of Botany*, 48 : 681-685.
29. Byrne M, Marquez-Garcia MI, Uren T, Smith DS, Moran GF (1996). Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany*, 44 : 331-341.
30. Campinhos EN, Junghans TG, Robinson IP, Bertolucci F, Alfenas AC (1997). A comparison between the efficiency of male-sterility and self-incompatibility in *Eucalyptus grandis* to promote interspecific hybridization. Conferencia IUFRO sobre silvicultura e Melhoramento de Eucaliptos, Brazil, IUFRO.
31. Campinhos EN, Peters RI, Bertolucci F, Alfenas AC (1998). Interspecific hybridization and inbreeding effect in seed from a *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clone orchard in Brazil." *Genetics and Molecular Biology*, 21 : 369-374.
32. Carr S, Carr DJ (1962). Convergence and progression in *Eucalyptus* and *Symphyomyrtus*. *Nature* 196 : 969-972.
33. Cauvin B (1991). Effet du placobutrazol sur la mise à fleur, la croissance de clones juvéniles d'eucalyptus. *Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL 1991-1992* : 71-88.
34. Chaix G, Rakotojanahary J (1996). Campagne de pollinisation contrôlée 1995-96. Projet création de vergers à graines forestières FED 6 ACP MAG 84, FOFIFA/Cirad-forêt, note D.R.F.P n° 719 : 10p.
35. Chaix G, Ramamonjisoa L (2001). Production de semences pour les reboisements malgaches. *Bois et Forêts des Tropiques*, 269 : 49-63.
36. Chaix G, Chantal I, Poitel M, Razafiarivelo S, Verhaegen D, Maillard JC (2002) Microsatellite primer amplification by multiplexing: a first application to *Eucalyptus grandis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20 : 67a-67e.
37. Champsoloix R (1961). La foresterie en savane à Madagascar. CTFT-Section de Madagascar, 44p.
38. Chase MR, Moller C, Kessel R, Bawa K (1996). Distant gene flow in tropical tree. *Nature*, 383 : 398-399.
39. Condit R, Huebhel SP (1991). Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, 37 : 66-71.
40. Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153 : 1989-2000.
41. Couvet D, Austerlitz F, Brachet S, Frascaria-Lacoste N, Jung-Muller, Kremer A, Streiff R (1999). Flux géniques chez les arbres forestiers – Synthèse bibliographique. INRA, 52 p.
42. Cotterill PP, Brolin A (1997). Improving Eucalyptus wood, pulp and paper quality by genetic selection. In the proceedings of the IUFRO Conference on Silviculture and on Improvement of Eucalyptus, Salvador, Brazil 24-29 august, 1997. Volume, 1 : 1-13.
43. Cowan, A., Marshall AH, Michaelson-Yeates TPT (2000). Effect of pollen competition and stigmatic receptivity on seed set in white clover (*Trifolium repens* L.). *Sexual Plant Reproduction*, 13 : 37-42.
44. Cremer, K (1971). Silvicultural practices adapted to seed supplies for natural regeneration of Mountain ash (*Eucalyptus regnans*) in Tasmania. *Australian Forestry*, 35 : 266-273.
45. Davidson J (1995). Ecological aspect of eucalyptus plantations. In the proceedings of the regional expert consultation on eucalyptus 4-8 october 1993, Volume 1, FAO regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok. FAO RAPA Publication 1995/6 : 35-72.
46. Davis AR (1997). Influence of floral visitation on nectar-sugar composition and nectary surface changes in *Eucalyptus*. *Apidologie*, 28 : 27-42.
47. Dayanandan S., Bawa K, Kesseli R (1997). Conservation of microsatellites among tropical trees (*Leguminosae*). *American Journal of Botany*, 84 : 1658-1663.
48. Dawson IK, Waugh R, Simons AJ, Powell W (1997). Simple sequence repeats provide a direct estimate of pollen-mediated gene dispersal in the tropical tree *Gliricidia sepium*. *Molecular Ecology*, 6 : 179-183.
49. Desplanques B, Boudry P, Broomberg K, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Dijk H van (1999). Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (*Chenopodiaceae*), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 98 : 1194-1201.
50. Dick CW (2001). Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 268 : 2391-2396.
51. Devlin B, Ellstrand NC (1990). The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. *Evolution*, 44 : 248-259
52. Département de Recherches Forestières et Piscicoles (1990). Introductions d'espèces exotiques à Madagascar - Projet inventaire des ressources ligneuses. Fofifa/MAE, 7 volumes, 1200 p.
53. Doran JC, Burgess IP (1993). Variation in floral bud morphology in the intergrading zones of *Eucalyptus camaldulensis* and *E. tereticornis* in northern Queensland. *Commonwealth Forestry Review*, 72 : 198-202.
54. Dow BD, Ashley MV (1996). Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology*, 5 : 615-627.
55. Dow BD, Ashley MV (1998). High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Heredity*, 89 : 62-70.
56. Durel CE, Bertin P, Kremer A (1996). Relationship between inbreeding depression and inbreeding coefficient in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Theoretical and Applied Genetics*, 92 : 347-356.

57. Dutech C, Seiter J, Petronelli P, Joly H, Jarne P (2002). Evidence of low gene flow in a neotropical clustered tree species in two rainforest stands French Guiana. *Molecular Ecology*, 11 : 725-738.
58. Eldridge KG (1975). Broad-leaved seed orchards. Part C. - Eucalyptus species.” Seed orchards. Forestry Commission Bulletin, 54 : 134-139.
59. Eldridge KG (1978). Genetic improvement of eucalypts. *Silvae Genetica*, 27 : 205-209.
60. Eldridge KG, Griffin AR (1983). Selfing effects in *Eucalyptus regnans*. *Silvae Genet*, 32 : 216-221.
61. Eldridge KG, Davidson J, Hardwood C, van Wyk G (1993). *Eucalyptus* domestication and breeding. Oxford University Press, Oxford, 288p.
62. El-Kassaby YA, Rudin D, Yaznadi R (1989). Levels of outcrossing and contamination in two *Pinus sylvestris* L. seed orchards in northern Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 4 : 41-49.
63. Ellegren H (1997). Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl. *Nature*, 389 : 593-598.
64. Ellegren H (2000). Microsatellite mutations in the germline : implication for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16 : 551-558.
65. Ellis MF, Sedgley M (1992). Breeding system and floral morphology of three species of *Eucalyptus* L’Her., section *Bisectaria* (*Myrtaceae*). *Australian Journal of Botany*, 40 : 249-262.
66. Ellis MF, Sedgley M (1993). Gynodioecy and male-sterility in *Eucalyptus leucosylon* Muell, F. (*Myrtaceae*). *International Journal of Plant Sciences*, 154 : 314-324.
67. Falconer DS (1974). Introduction à la génétique quantitative. Masson et Cie, 284 p.
68. Food and Agricultural Organisation (1997). State of the world’s forests 1997. Comptes rendus du XI Congrès Forestier Mondial, 13-22 octobre 1997, Antalya, Turquie, 182 p.
69. Food and Agricultural Organisation (2000). The global outlook for future wood supply from forest plantations. Global Forest Products Outlook Study Working Paper Series, Rome, 145p.
70. Food and Agricultural Organisation (2002). <http://www.fao.org>.
71. Florence RG (1996). Ecology and silviculture of eucalypt forests. Csiro, Australia : 413p.
72. Free JB, Williams IH (1972). The transport of pollen on the body hairs of honeybees (*Apis mellifera* L.) and bumblebees (*Bombus spp.* L.). *Inconnu* : 609-615.
73. Friedman ST, Adams WT (1985a). Levels of outcrossing in two loblolly pine seed orchards. *Silvae Genetica*, 34 : 157-162.
74. Friedman ST, Adams WT (1985b). Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 69 : 609-615.
75. Gaiotto FA, Bramucci M, Grattapaglia D (1997). Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95 : 5-6.
76. Galiana A (2001). Etat annuel des recherches sur la transformation génétique des arbres forestiers - Synthèse bibliographique. Cirad-forêt Montpellier : 13 p.
77. GENETIX (2001). Logiciel sous Windows™ version 4.02 pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
78. Gerber S, Mariette D, Streiff R, Bodènès C, Kremer A (2000). Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology*, 9 : 1037-1048.
79. Gérard J, Baillères H (1999). Utilisation des eucalyptus en bois d’œuvre : facteurs limitants, itinéraires techniques et potentialités. *Le Flamboyant - Spécial eucalyptus*, 49 : 33-38.
80. Grant V (1950). The flower constancy of bees. *Botanical Review*, 16 : 379-396.
81. Griffin A (1980). Floral phenology of a stand montain ash (*Eucalyptus regnans* F. Muell.) in Gippsland, Victoria. *Australian Journal of Botany*, 28 : 393-404.
82. Griffin A, Moran GF, Fripp YJ (1987). Preferential outcrossing in *Eucalyptus regnans* F. Muell. *Australian Journal of Botany*, 35 : 465-475.
83. Griffin AR, Burgess IP, Wolf L (1988). Patterns of natural and manipulated hybridisation in the genus *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany*, 36 : 41-66.
84. Griffin AR, Cotteril PP (1988). Genetic variation in growth of outcrossed, selfed and open-pollinated progenies of *Eucalyptus regnans* and some implications for breeding strategy. *Silvae Genetica*, 37 : 124-131.
85. Goto S, Miyahara F, Ide Y (2002). Identification of the male parents of half-sib progeny from Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) clonal seed orchard using RAPD markers. *Breeding Science*, 52 : 71-77.
86. Govindaraju DR (1989). Estimates of gene flow in forest trees. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37 : 345-357.
87. Grosser C, Vaillancourt R, Potts B, O’Sullivan H (2001). Paternity analysis in a *Eucalyptus nitens* clonal seed orchard. In: Proceedings developing the eucalypt of the future, IUFRO International Symposium 10-15 Sept. 2001, Valdivia, Chili : 133.
88. Guadagnuolo R, Savova-Bianchi D, Felber F (2001). Gene flow from wheat (*Triticum aestivum* .) to jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host.), as revealed by RAPD and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 103 : 1-8.

89. Hall P, Orrell LC, Bawa KS (1994). Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *American-Journal of Botany*, 81 : 1104-1111.
90. Hamrick JL, Godts MJW, Sherman-Broyles SL (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6 : 95-124.
91. Harbard JL, Griffin AR, Espejo J (1999). Mass controlled pollination of *Eucalyptus globulus* : a practical reality. *Canadian Journal Forest Research*, 29 : 1457-1463.
92. Harcourt RL, Kyoizuka J, Floyd RB, Bateman KS, Tanaka H, Decroocq V, Llewellyn DJ, Zhu X, Peacock WJ, Dennis ES (2000). Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. *Molecular Breeding*, 6 : 307-315.
93. Hardi T, Kanso (1995). The role of European honey bees (*Apis mellifera* L.) in the pollination of a plantation of a eucalypt in Pati. *Honeybee Science*, 16 : 24-26.
94. Hardner CM, Potts BM (1995). Inbreeding depression and changes in variation after selfing in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*. *Silvae Genetica*, 44 :46-54.
95. Hardner CM, Vaillancourt RE, Potts BM (1996). Stand density influences outcrossing rate and growth of open-pollinated families of *Eucalyptus globulus*. *Silvae Genetica*, 45 : 226-228.
96. Hardner CM, Potts BM (1997). Postdispersal selection following mixed mating in *Eucalyptus regnans*. *Evolution*, 51 : 103-111.
97. Hardner CM, Potts BM, Gore PL (1998). The relationship between cross success and spatial proximity of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* parents. *Evolution*, 52 : 614-618.
98. Hardner C, Tibbitts W (1998). Inbreeding depression for growth, wood and fecundity traits in *Eucalyptus nitens*. *Forest Genetics*, 5 :11-20.
99. Herrmann J (1984). The *Drosophila* fly in *Eucalyptus* flowers - who holds the answers to the riddle. *South African Bee Journal*, 56 : 5-8.
100. Hingston AB, Potts BM (1998). Floral visitors of *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* in eastern Tasmania. *Tasforests*, 10 : 125-139.
101. Hodge GR, Volker PW, Potts BM, Owen JV (1996). A comparison of genetic information from open-pollinated and control-pollinated progeny tests in two eucalypt species. *Theoretical and Applied Genetics*, 92 : 53-63.
102. Hodgson LM (1976a). Some aspects of flowering and reproductive behavior in *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden at JDM Keet Forest Research Station: 1. The fruit, seed, seedlings, self fertility, selfing and inbreeding effects. *South African Forestry Journal*, 97 : 32-43.
103. Hodgson LM (1976b). Some aspects of flowering and reproductive behavior in *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden at JDM Keet Forest Research Station: 2. Flowering, controlled pollination methods, pollination and receptivity. *South African Forestry Journal*, 97 : 18-28.
104. Hodgson LM (1976c). Some aspects of flowering and reproductive behavior in *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden at JDM Keet Forest Research Station: 3. Relative yield, breeding systems, barriers to selfing and general conclusions. *South African Forestry Journal*, 99 : 53-60.
105. Hodgson LM (1977). In situ grafting in *Eucalyptus grandis* seed orchards at J.D.M. Keet Forest Research Station. *South African Forestry Journal*, 102 : 58-60.
106. Horskins K, Turner VB (1999). Resource use and foraging patterns of honeybees, *Apis mellifera*, and native insects on lowers of *Eucalyptus costata*. *Australian Journal Ecology*, 24 : 221-227.
107. House SM (1997). Reproductive biology of eucalypts. In 'Eucalypt ecology: individuals to ecosystems'. (Eds) J Williams, J Woinarski, Cambridge University Press, Melbourne : 30-55.
108. House APN, Bell JC (1994). Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. *Silvae Genetica*, 43 : 167-176.
109. House APN, Bell JC (1996). Genetic diversity, mating system and systematic relationships in two red mahoganies, *Eucalyptus pellita* and *E. scias*. *Australian Journal of Botany*, 44 : 157-174.
110. HuanLin L, TianHua C (1997). A study gene flow between a Masson pine seed orchard and a plantation near the orchard. *Journal of Nanjing Forestry University*, 21 : 37-41.
111. Huoran W, Xiuwu C, Yongqi Z, Daoqun Z, Yulin F, Weihui W (1994). Provenance variation in the growth rate and wood properties of *Eucalyptus grandis*. *Forest Research* 7 : 199-202.
112. Isagi Y, Kanazashi T, Suzuki W, Tanaka H, Abe T (2000). Microsatellite analysis of the regeneration process of *Magnolia obovata* Thumb. *Heredity*, 84 : 143-151.
113. ISTA (1985). Seed Sciences and Technology. Comptes rendus de l'ISTA, règles internationales pour les essais de semences, Vol. 13 supplément 2. Draper Edition : 230p.
114. ISTA (1998). Tropical and sub-tropical tree and shrub seed handbook. ISTA Zurich : 50-60.
115. Jackson JF (1996). Gene flow in pollen in commercial almond orchards. *Sexual Plant Reproduction*, 9 : 367-369.
116. James SH, Kennington WJ (1993). Selection against homozygotes and resource allocation in the mating system of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *Australian Journal of Botany*, 41 : 381-391.
117. Jamieson A, Taylor SS (1997). Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 28 : 397-400.

118. Jones WR, van Staden J (2001). The reproductive sequences of four important commercial Eucalyptus species in South Africa. In: Proceedings developing the eucalypt of the future, IUFRO International Symposium 10-15 September 2001, Valdivia, Chili : 135.
119. Jouanin L, Goujon T, Nadaï V de, Martin MT, Mila I, Vallet C, Pollet B, Yoshinaga A, Chabbert B, Petit-Conil M, Lapierre C (2000). Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiology*, 123 : 1363-1373.
120. Junghans TG, Peters RI, Bertolucci FL, Alfenas AV (1998). The use of self-incompatibility in the production of hybrid eucalyptus seed by 'Aracruz celulose' in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 21 : 375-379.
121. Kameyama Y, Isagi Y, Naito K, Nakagoshi N (2000). Microsatellite analysis of pollen flow in *Rhododendron metternichii* var. *bondunese*. *Ecol Res*, 15 : 263-269
122. Kaufman SR, Smouse PE, Alvarez-Buylla ER (1998). Pollen-mediated gene flow and differential male reproductive success in a tropical pioneer tree, *Cecropia obtusifolia* Bertol. (*Moraceae*): a paternity analysis. *Heredity*, Volume 81 : 164-173.
123. Konuma A, Tsumura Y, Lee CT, Lee SL, Okuda T (2000). Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (*Dipterocarpaceae*), inferred from paternity analysis. *Molecular Ecology* 9 : 1843-1852.
124. Koski V (1975). Broad-leaved seed orchards. Part A. - Note on temperate broadleaved species including intensive methods for small-seeded species. Seed orchards. Forestry Commission Bulletin, 54 : 128-130.
125. Krauss SL, Peakall R (1998). An evaluation of the AFLP Fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural populations of *Persoonia mollis* (Proteaceae). *Australian Journal of Botany* 46 : 533-546.
126. Lambeth C, Lee BC, O'Malley D, Wheeler N (2001). Polymix breeding with parental analysis of progeny: an alternative to full-sib breeding and testing. *Theoretical and Applied Genetics*, 103 : 930-943.
127. Law B, Mackowski C, Schoer L, Tweedie T (2000). Flowering phenology of *myrtaceous* trees and their relation to climatic, environmental and disturbance variables in northern New South Wales. *Austral Ecology*, 25 : 160-178.
128. Lebot V (1992). Le programme d'amélioration génétique des espèces feuillues exotiques destinées aux reboisements à Madagascar - Rapport annuel 1992. FOFIFA/Cirad-forêt : 35p.
129. Lebot V, Ranaivoson L (1994). Eucalyptus genetic improvement in Madagascar. *Forest Ecology and Management*, 63 : 135-152.
130. Lee (2000). Mating system parameters of *Dryobalanops aromatica* Gaertn. F. (*Dipterocarpaceae*) in three different forest types and a seed orchard. *Heredity*, 84 : 338-345.
131. Leite SMM, Bonine CA, Lopes CR, Mori ES, Valle CF do, Marino CL (1997). Genetic variation within a base population of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden using RAPD markers. *Conference IUFRO sobre silvicultura e Melhoramento de Eucaliptos* : 71-74.
132. Levin DA, Kerster HW (1974). Gene flow in seed plants. *Evolutionary Biology*, 7 : 139-220.
133. Llewellyn D, Kyoizuko J, Floyd R, Tanaka H, Harcourt R, Decroocq V, PingHua H, XiaoMei Z, Dennis E, Peacock WJ (1999). Transgenic eucalypts [*Eucalyptus camaldulensis*] with insect resistance and herbicide tolerance. Proceedings of the Second International Wood Biotechnology Symposium, (eds) Jamieson, A., Canberra, Australia, 10-12 March, 1997 : 115-120.
134. Looock EEM (1970). Eucalyptus species suitable for the production of honey. Pretoria, Department of forestry.
135. Lourmas M (2001). Analyse des flux de gènes efficaces dans la cédraie du petit lubéron. Mémoire de DEA, Université Montpellier II : 1-33.
136. Matheson AC, White TL, Powell GR (1995). Effects of inbreeding on growth, stem form and rust resistance in *Pinus elliottii*. *Silvae Genetica*, 44: 37-46.
137. Martins-Corder MP, Lopes CR (1997). Isozyme characterization of *Eucalyptus urophylla* (S. T. Blake) and *E. grandis* (Hill ex Maiden) populations in Brazil. *Conferencia IUFRO sobre silvicultura e Melhoramento de Eucaliptos, Brazil, IUFRO*.
138. Martins-Corder MP, Mori ES, Carvalho MTV, Derbyshire E (1998). Genetic diversity of three size classes of seeds of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*. *Silvae Genetica*, 47 : 6-14.
139. Meskinen G, Franklin EC (1984). Hybridity in the *Eucalyptus grandis* breeding population in Florida, USDA - Forest service.
140. Millar MA, Byrne M, Coates DJ, Stukely MJC, McComb JA (2000). Mating system studies in jarrah, *Eucalyptus marginata* (*Myrtaceae*). *Australian Journal of Botany* 48 : 475-479.
141. Mitchell RJ (1997). Effects of pollen quantity on progeny vigor : evidence from the desert mustard *Lesquerella fendleri*. *Evolution*, 51 : 1679-1684.
142. Moncur MW, Kleinschmidt GJ (1992). A role of honey bees (*Apis mellifera*) in eucalypt plantations. In : IUFRO-AFOCEL (eds). Mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species. Proceedings of conference, September 14-18, 1992, Bordeaux : 107-115.

143. Moncur MW, Charles R, Kleinschmidt GJ (1993). Can honeybees increase seed production in blue gum, *Eucalyptus globulus*? Australian Beekeeper, 95 : 248-253.
144. Moncur MW, Rasmussen GF, Hasan O (1994). Effect of paclobutrazol on flower-bud production in *Eucalyptus nitens* espalier seed orchards. Canadian Journal of Forest Research, 24 : 46-49.
145. Moncur MW, Mitchell A, Fripp Y, Kleinschmidt GJ (1995) The role of honeybees (*Apis mellifera*) in eucalypt and acacia seed production areas. Comm Forestry Review, 64 : 350-354.
146. Moore SS, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M, Hetzel DJS (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. Genomics, 10 : 654-660.
147. Moran GF (1992). Patterns of genetic diversity in Australian tree species. New Forest 6 :49-66.
148. Moran GF, Brown AHD (1980). Temporal heterogeneity of outcrossing rates in alpine ash (*Eucalyptus delegatensis* R.T. Bak.). Theoretical and Applied Genetics, 57 : 101-105.
149. Moran GF, Bell JC, Griffin AR (1989). Reduction in levels of inbreeding in a seed orchard of *Eucalyptus regnans* F. Muell. compared with natural populations. Silvae Genetica, 38 : 32-36
150. Morgante M, Rafalski A, Biddle P, Tingey S (1994). Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. Genome, 37 : 763-769.
151. Mouranche R (1956). Les Eucalyptus à Madagascar. Problèmes fondamentaux de la plantation. Antananarivo, CTFT-Section de Madagascar : 16p.
152. Muona O, Harju A (1989). Effective population sizes, genetic variability, and mating system in natural stands and seed orchards of *Pinus sylvestris*. Silvae-Genetica, 38 : 221-228.
153. Nathan SS, Murugan K, Kumar NS, Jeyabalan D, Muthuraman S (1999). Pollination potential bee *Apis florae* Linn. In relation to biochemical profiles of host plants. Zoos'Print Journal, 14 : 3-4.
154. Nesbitt KA, Potts BM, Vaillancourt RE, Reid JB (1997). Fingerprinting and pedigree analysis in *Eucalyptus globulus* using RAPDs. Silvae Genetica, 46 : 6-11.
155. Nest van der (2000). Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). Plant Breeding, 119 : 433-436.
156. Nei M (1972) Genetic distance between populations. American Naturalist, 106 : 283-292.
157. Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89 : 583-590.
158. Oddie RLA, McComb JA (1998). Stigma receptivity in *Eucalyptus camaldulensis* Denh. Silvae Genetica, 47 : 142-146.
159. Oddou-Muratorio S, Petit RJ, Legueroue B, Guesnet D, Demesure B (2001). Pollen-versus seed-mediated gene flow in a scattered forest tree species. Evolution International Journal Organisms Evolution, 55 : 1123-1135.
160. Pakkanen A, Nikkanen T, Pulkkinen P (2000). Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. Scandinavian Journal Forest Research, 15 : 399-404.
161. Pandey D (1997). Hardwood plantations in the tropics and subtropics. Tropical forest plantations area 1995. Rapport interne de la FAO : 76 p.
162. Patterson B, Potts B, Vaillancourt R (2001). Variation in outcrossing rates within the canopy of *Eucalyptus globulus*. In: Proceedings developing the eucalypt of the future, IUFRO International Symposium 10-15 Sep. 2001, Valdivia, Chil : 132.
163. Paule L, Lindgren D, Yaznadi R (1993). Allozyme frequencies, outcrossing rate and pollen contamination in *Picea abies* seed orchards. Scandinavian Journal of Forest Research; 8 : 8-17.
164. Peters GB, Lonie JS, Moran GF (1990). The breeding system, genetic diversity and pollen sterility in *Eucalyptus pulverulenta*, a rare species with small disjunct populations. Australian Journal of Botany, 38 : 559-570.
165. Phillips MA, Brown AHD (1977). Mating system and hybridity in *Eucalyptus pauciflora*. Australian Journal of Biological Sciences, 30 : 337-344.
166. Plomion C (1999). Carte génétique / carte Physique. Principes des techniques de biologie moléculaire Ed. Tagu D. INRA : 127-129.
167. Plomion C, Durel CE, Verhaegen D (1996). Utilisation des marqueurs moléculaires dans les programmes d'amélioration génétique des arbres forestiers : exemple du pin maritime et de l'eucalyptus. Annales des Sciences Forestières, 53 : 819-848.
168. Plomion C, LeProvost G, Pot D, Vendramin G, Gerber S, Decroocp S, Brach J, Raffin A, Pastuszka P (2001). Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. Canadian Journal Forest Research, 31 : 1816-1825.
169. Potts BM, Potts WC, Cauvin B (1987). Inbreeding and interspecific hybridisation in *Eucalyptus gunii*. Silvae Genetica, 36 :194-198.
170. Potts B, Savva M (1989). Self-incompatibility in *Eucalyptus*. Melbourne, Plant Cell Biology Research Centre.
171. Prober SM, Tompkins C, Moran GF, Bell JC (1990). The conservation of *Eucalyptus paliformis* L. Johnson et Blaxell and *E. parvifolia* Cambage, two rare species south-earthen Australia. Australian Journal of Botany, 38 : 79-85.

172. Pryor LD (1976). The biology of Eucalypts. Edwards Arnold, London : 82p.
173. Quesada, M., Fuch EJ, Lobo JA (2001). Pollen load size, reproductive success, and progeny kinship of naturally pollinated flowers of the tropical dry forest tree *Pachira quinata* (Bombacaceae). American Journal of Botany, 88 : 2113-2118.
174. Rakotomavo R (1995). Dynamique et extension des boisements d'eucalyptus dans le bassin versant du Jabo : l'exemple du terroir d'Avaratrambolo. Projet TERRE-TANY : 8p.
175. Ramanantoandro T (2000). Production d'un verger à graines d'*Eucalyptus grandis* à Madagascar : Etude des potentialités et de la variabilité. Mémoire Fin d'études, Ecole des Sciences Supérieures d'Agronomie, Université D'Antananarivo, Madagascar : 70p.
176. Randrianandianina NB (1971). Les Paysans et le Reboisement dans la Région d'Ivato. Mémoire ENSA-SSF Antananarivo, Madagascar : 52p.
177. Ranaivoson AL (1993). *Eucalyptus robusta* SM : Etude de l'amélioration génétique à Madagascar. Thèse de Doctorat Ingénieur en Sciences Agronomiques. ESSA-Forêt Antananarivo, Madagascar : 213p.
178. Rannala B, Mountain JL (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 9197-9201.
179. Randrianjafy H (2000). Les plantations d'eucalyptus à Madagascar : Superficie, rôle et importance des massifs. Fofifa-Drfp : 18p.
180. Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity, 83 : 239
181. Razafiarivelo S (1999). Description à l'aide de marqueur microsatellites de la variabilité génétique des arbres d'un verger à graines d'*Eucalyptus grandis* à Madagascar. Mémoire de DEA, Université d'Antananarivo, Madagascar : 44p.
182. Razafimaharo V (2001). Analyse des flux géniques par pollen à l'aide de marqueurs microsatellites dans un verger à graines d'*Eucalyptus grandis* à Madagascar. Mémoire DEA, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques Département Forêt, Antananarivo, Madagascar : 40p.
183. Reddy KV, Rockwood DL, Comer CW, Meskinen GF (1985). Predicted genetic gains adjusted for inbreeding for an *Eucalyptus grandis* seed orchard. In : Proc. 18th S. For. Tree. Imp. Conf., Long Beach, Miss : 283-289.
184. Revista da Madeira wood magazine. Eucalipto - A Madeira do futuro. Revista da Madeira wood magazine, especial : 120p.
185. Ritland K, Jain S (1981). A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. Heredity, 47 : 35-52.
186. Rockwood DL, Meskinen GF (1991). Comparison of *Eucalyptus grandis* provenances and seed orchards in a frost frequent environment. Suid Afrikaanse Bosbouidskrif, 159 : 51-59.
187. Rosseto M, Harriss FCL, Mclachlan A, Henry RJ, Baverstock PR, Lee LS (2000). Interspecific amplification of tea tree (*Melaleuca alternifolia* - Myrtaceae) microsatellite loci - potential implications for conservation studies. Australian Journal of Botany, 48 : 367-373.
188. Rudin D, Lindgren D (1977). Isozyme studies in seed orchards. Studia Forestalia Suecica, 139 : 1-23.
189. Rüter B, Hamrick JL, Wood BW (2000). Outcrossing rates and relatedness estimates in pecan (*Carya illinoensis*) populations. Journal of Heredity, 91 : 72-75.
190. Sampson JF (1998). Multiple paternity in *Eucalyptus rameliana*. Heredity, 81(3) : 349-355.
191. Sampson JF, Hopper SD, James SH (1995). The mating system and genetic diversity of the Australian arid zone mallee, *Eucalyptus rameliana*. Australian Journal of Botany, 43 : 461-474.
192. Sato AS, Mori ES (1996). Detection of inbreeding in seeds of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. Revista Instituto Florestal 8 : 131-134.
193. Schmidt-Adam G, Young AG, Murray BG (2000). Low outcrossing rates and shift pollinators in new Zealand Pohutukawa (*Metrosideros excelsa*; Myrtaceae). American Journal of Botany, 87(9) :1265-1271.
194. Schuster WSF, Mitton JB (2000). Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis* James). Heredity, 84 : 348-361.
195. Sedgley M, Smith RM (1989). Pistil receptivity and pollen tube growth in relation to the breeding of *Eucalyptus woodwardi*. Annals of Botany, 64 : 21-31.
196. Sedgley MF, Hand C, Smith RM, Griffin AR (1989). Pollen tube growth and early seed development in *Eucalyptus regnans* F. Muell. (Myrtaceae) in relation to ovule structure and preferential outcrossing" Australian Journal of Botany, 37 : 397-411.
197. Senio ML, Heun M (1993). Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. Genome, 36 : 884-889.
198. Setterfield S, Williams R (1996). Patterns of flowering and seed production in *Eucalyptus miniata* and *E. tetradonta* in a tropical savanna woodland, northern Australia. Australian Journal of Botany, 44 : 107-122.
199. Sidhu DS, Singh A (1996). Extend of inbreeding depression in nursery seedlings for growth character of *Eucalyptus tereticornis* sm. Tree Improvement for sustainable Tropical Forestry, Caloundra australia, IUFRO.

200. SNGF, 1999. Rapport annuel 1998. Madagascar, Antananarivo : 31 p.
201. SNGF, 2000. Rapport annuel 1999. Madagascar, Antananarivo : 28 p.
202. Steane DA, Byrne M (1998). Chloroplast DNA polymorphism signals complex interspecific interactions in *Eucalyptus* (Myrtaceae). Australian Systematic Botany, 11 : 25-40.
203. Steane DA, Vaillancourt RE, Russel J, Powell W, Marshall D, Potts BM (2001). Development and characterisation of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). Silvae Genetica, 50 : 89-91.
204. Stoehr MU, Orvar BL, Vo TM, Gawley JR, Webber JE, Newton CH (1998). Application of chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. Canadian Journal of Forestry Research, 28 : 187-195.
205. Stoehr MU, Newton CH (2002). Evaluation of mating dynamics in a lodgepole pine seed orchard using chloroplast DANN markers. Canadian Journal of Forest Research, 32 : 469-476.
206. Streiff R (1998). Structure génétique spatiale et flux polliniques dans une chênaie mixte : *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus robur* L. Thèse de l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc : 90p.
207. Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkeller H, Glössl, Kremer A (1998). Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. Molecular Ecology, 7 : 317-328.
208. Streiff R, Ducouso A, Lexer C, Steinkellner H, Gloessl J, Kremer A (1999). Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* and *Q. petraea*. Molecular Ecology, 8 : 831-841.
209. Thomson JD, Price MV, Waser NM, Stratton DA (1986). Pollen transport and deposition by bumble bees in *Erythronium* : Influences of floral nectar and bee grooming. Journal of Ecology, 74 : 329-341.
210. Tibbits WN (1989). Controlled pollination studies with shinning gum (*Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden). Forestry, 62 : 111-126.
211. Turnbull J, Doran J (1987). Seed development and germination in the Myrtaceae. Germination of australian native plant. P. Lankamp. Melbourne, Inkata Press : 46-57.
212. Vaissière BE, Rodet G, Cousin M, Bottela L, Torrégrossa JP (1996). Pollination effectiveness of honeybees in a kiwifruit orchard. Horticultural Entomology, 89 : 453-461.
213. Wyk van G (1977). Early growth results in a diallel progeny test of *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden. II. A greenhouse study. Silvae Genetica, 26 : 44-50.
214. Wyk van G (1981). Inbreeding effects in *Eucalyptus grandis* in relation to degree of relatedness. South African Forestry Journal, 116 : 60-63.
215. Vigneron P (2000). Classification des sous genres *Symphomyrtus* et *Telocalyptus*, genre *Eucalyptus* l'Herit. (Myrtaceae). Cirad-forêt, Montpellier : 20p.
216. Vigneron P, Bouvet JM (1997). Amélioration des plantes tropicales ; les eucalyptus. Editions CIRAD : 265-288.
217. Volker PW, Dean CA, Tibbits WM, Ravenwood IC (1990). Genetic parameters and gains expected from selection in *Eucalyptus globulus* in Tasmania. Silvae Genetica, 39 : 18-21.
218. Wang XR, Lindgren D (1991). Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers. Scandinavian Journal of Forest Research, 6 : 379-385.
219. Wei W, Yingqian Q, Keping M (1999). Gene flow between transgenic crops and their wild related species. Acta Botanica Sinica, 41 : 343-348.
220. Wheeler NC, Jech KS (1992). The use of electrophoretic markers in seed orchard research. International Symposium held jointly by IUFRO Working Parties S2.04.05 and S2.04.01, Corvallis, Oregon, Kluwer Academic Publishers : 311-328.
221. White G, Boshier DH, Powell W (2002). Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. Ecology, 99 : 2038-2042.
222. Williams DR, Potts BM, Black PG (1999). Testing single visit pollination procedures for *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. Australian forestry, 62 : 346-352.
223. Wiltshire RJE; Potts BM; Reid JB (1998). Genetic control of reproductive and vegetative phase change in the *Eucalyptus risdonii*-*E. tenuiramis* complex. Australian Journal of Botany, 46 : 45-63.
224. Wilson RA, Astorga R, Gomez C, Gonzalez-Rio F (1995). Papermaking with DNA. 'Intelligent Fibre'. In the proceedings of the CRCTHF-IUFRO Conference ; Eucalypt plantations : improving fibre yield and quality, Hobart, Australia, 19-24 February 1995 : 5-9.
225. Wu KS, Tanksley SD (1993). Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Molecular and General Genetics, 241 : 225-235.
226. Yeh F, Brune A, Cheliak WM, Chipman DC (1983). Mating system of *Eucalyptus citriodora* in a seed-production area. Canadian Journal of Forest Research, 13 : 1051-1055.
227. Zobel BJ, Barber J, Brown CL, Perry TO (1958). Seed orchards - Their concept and management. Journal of Forestry 58 : 815-825.

PUBLICATIONS

Articles publiés

Production de semences pour les reboisements
malgaches

(Bois et Forêts des Tropiques n°269 : 49-64)

Microsatellite primer amplification by multiplexing: a
first application to *Eucalyptus grandis*

(Plant Molecular Biology Reporter 20 : 67a - 67e)

Production de semences pour les reboisements malgaches

À Madagascar, les plantations en eucalyptus et en pins satisfont aux enjeux de production et de protection de l'environnement. Le Silo national des graines forestières (SNGF) approvisionne le marché national en espèces exotiques et il diffuse directement les obtentions issues des recherches. Parallèlement, le gouvernement malgache favorise la normalisation de la récolte et la commercialisation des graines.

Gilles CHAIX

CIRAD-Forêt, FOFIFA, DRFP
BP 745, Antananarivo 101
Madagascar

Lolona RAMAMONJISOA

Silo national des graines forestières (SNGF)
BP 5091, Antananarivo 101
Madagascar



Déforestation ultime : paysage typique du moyen-ouest.

Ultimate deforestation: typical landscape in the middle-west.

RÉSUMÉ

PRODUCTION DE SEMENCES POUR LES REBOISEMENTS MALGACHES

Étant donné la faiblesse et la régression de la couverture forestière, l'accroissement de la demande en bois et la fragilité des sols à Madagascar, les plantations forestières sont nécessaires au développement de l'île. Les plantations en eucalyptus et en pins, dont l'adaptation aux différentes conditions bioclimatiques est remarquable, satisfont aux enjeux de production et de protection de l'environnement. Aujourd'hui, la tendance s'oriente vers le reboisement en milieu paysan. Le FOFIFA, avec l'appui du CIRAD-Forêt, s'est donné de nouveaux objectifs de recherche. Les services forestiers ont favorisé le développement de ce secteur en mettant en place le Silo national des graines forestières (SNGF), dont le mandat principal est de diffuser des semences de qualité. Les travaux de recherche forestière de ces vingt dernières années ont permis de porter à 180 ha la surface du réseau national de production en graines. Celui-ci approvisionne le marché national en espèces exotiques à travers le SNGF qui diffuse directement les obtentions issues des recherches. Parallèlement, le gouvernement malgache a renforcé l'impact de cette filière semencière en normalisant la récolte et la commercialisation des graines. Les politiques forestière, agricole et environnementale ont été redéfinies. Elles sont destinées, entre autres, à améliorer la protection des sols et à favoriser l'extension des superficies reboisées. Néanmoins, il reste encore à améliorer et à pérenniser le dispositif de production semencière et à étendre la diffusion des acquis en associant les efforts de la recherche, du SNGF et des utilisateurs.

Mots-clés : semence forestière, reboisement paysan, eucalyptus, pin, Madagascar.

ABSTRACT

SEED PRODUCTION FOR MADAGASCAN AFFORESTATION

In view of the paucity of the forest cover, its continuing regression, the increase in the demand for timber and the fragility of Madagascar soils, forest plantations are of capital importance in the development of the island. Plantations of eucalyptus and pine, which adapt remarkably well to different bioclimatic conditions, should be able to meet production requirements while protecting the environment. Today, the trend is to adopt an approach based on afforestation implemented by local farmers. FOFIFA, supported by CIRAD-Forêt, has adopted new research objectives in this context. Forest services have promoted development in this sector by setting up the national Silo for forest seeds (SNGF) whose primary role is to distribute good quality seed. Forest research over the last twenty years has increased to 180 ha the surface area devoted to national seed production. This network supplies the national market with non-native species through SNGF which then directly distributes the seed produced by the research efforts. In parallel, the Madagascar government has enhanced the impact of this seed production by standardizing harvesting and seed marketing. Forestry, agricultural and environmental policies have been redefined. These new policies are intended to improve soil protection and increase the surface area for afforestation. However, the seed production system still requires firm establishment and improvement along with more widespread use of the system through combined efforts by research, SNGF and users.

Keywords: forest seed, farmer afforestation, eucalyptus, pine, Madagascar.

RESUMEN

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS PARA LAS REFORESTACIONES MALGACHES

Las plantaciones forestales son necesarias para el desarrollo de la isla de Madagascar debido a la debilidad y a la regresión de la cubierta forestal, el incremento de la demanda de madera y la fragilidad de sus suelos. Las plantaciones de pinos y eucaliptos, con una sobresaliente capacidad de adaptación a las diferentes condiciones bioclimáticas, satisfacen las exigencias de producción y protección medioambiental. Actualmente, la tendencia se orienta hacia la repoblación en medio campesino. El FOFIFA, con el apoyo del CIRAD-Forêt, ha establecido nuevos objetivos de investigación. Los servicios forestales han favorecido el desarrollo de este sector creando el Silo Nacional de Semillas Forestales (SNGF) cuya principal misión es la difusión de semillas de calidad. Los trabajos de investigación forestal de los últimos veinte años han permitido que la superficie de la red nacional de producción de semillas llegue a 180 ha. Ésta abastece el mercado nacional en especies exóticas a través del SNGF que difunde directamente los frutos de sus investigaciones. Paralelamente, el gobierno malgache ha reforzado el impacto de este sector semillero normalizando la cosecha y comercialización de las semillas. Se han reorientado las políticas forestal, agrícola y medioambiental, destinándolas, entre otras cosas, a mejorar la protección de suelos y a favorecer la extensión de áreas reforestadas. Sin embargo, aún se debe mejorar y consolidar el dispositivo de producción semillera y divulgar los logros asociando los esfuerzos de la investigación, del SNGF y de los utilizadores.

Palabras clave: semilla forestal, reforestación campesina, eucalipto, pino, Madagascar.

Madagascar et sa problématique forestière

L'île est confrontée à une régression de sa couverture forestière qui met en péril la production agricole et donc l'alimentation de la population à 80 % rurale. Les reboisements et les études menées pour leur extension sont nombreuses et datent de plus de 60 ans. Les connaissances sur la filière (choix d'espèces, techniques de plantation, sylviculture, amélioration génétique) sont particulièrement précises, notamment en matière de semences forestières. Les reboisements sont considérés par l'État malgache comme une priorité. Après une introduction sur le secteur des reboisements, les auteurs présentent le dispositif de production de semences forestières mis en place à Madagascar.

Présentation physique

Madagascar offre une grande diversité de climats (carte 1) du fait de son relief, des influences maritimes et de sa taille (587 040 km², du 12^e au 25^e parallèle). On peut distinguer quatre grandes zones.

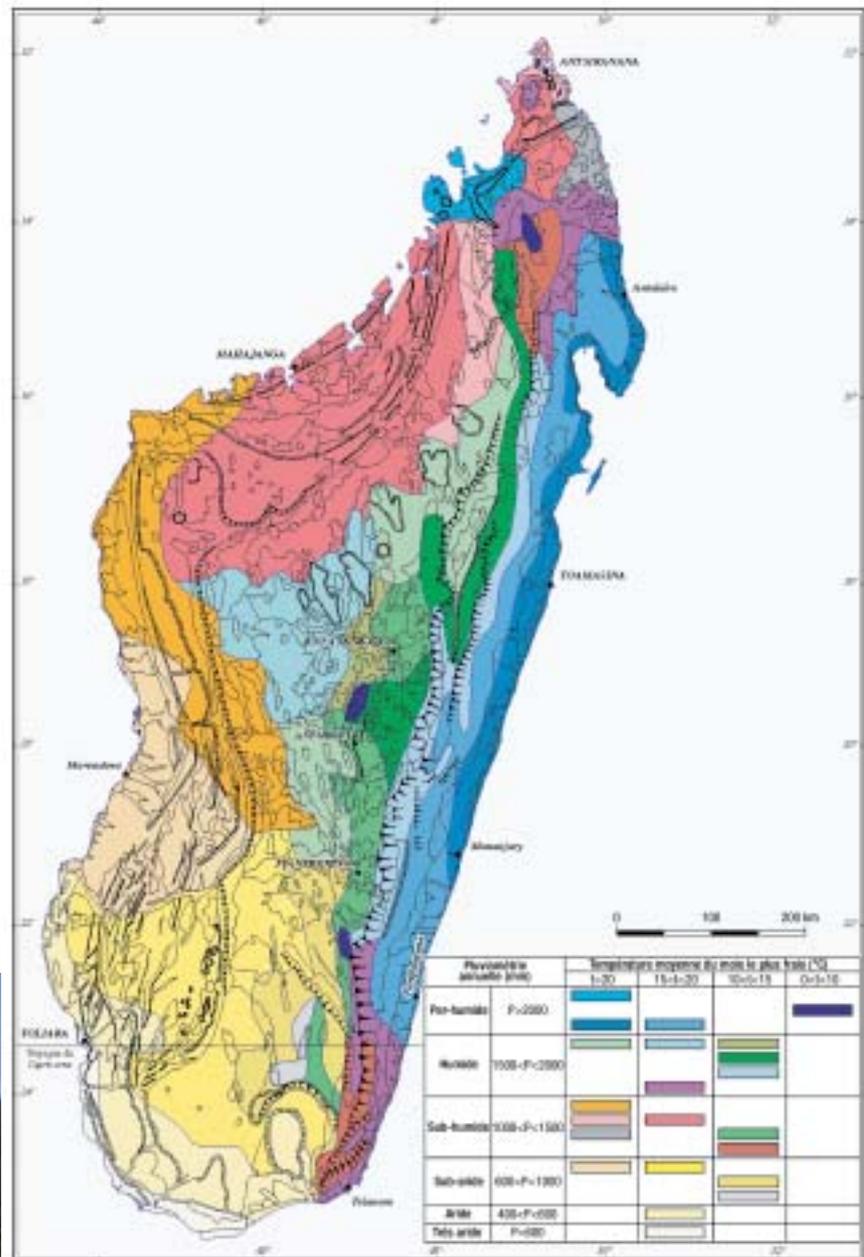
- Les Hautes-Terres de la zone centrale sont densément peuplées et très peu boisées. Les caractéristiques de cette région d'altitude sont fortement influencées par la topographie accidentée et l'acidité des sols.

Dans cette région, l'influence de ces facteurs a favorisé une érosion importante. Celle-ci met en péril la productivité des terrains agricoles, essentiellement constitués de rizières irriguées. La pluviométrie varie de 1 200 à 1 800 mm/an avec quatre à six mois secs, la température moyenne est de 19 °C.

Carte 1

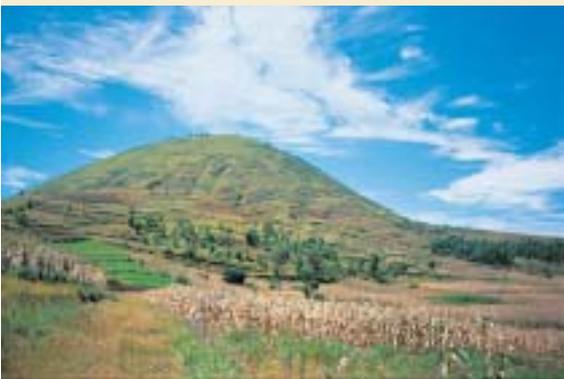
Les régions climatiques de Madagascar. (CIRAD, d'après Humbert et Cours-Darne modifié).

Climatic regions of Madagascar. (CIRAD, according to Humbert and Cours-Darne, modified).



Un environnement fragilisé : région d'Antsirabe (▲) et paysage du sud (Ihosa) (▼).

A weakened environment: Antsirabe region (▲) and southern landscape (Ihosa) (▼).



- La région occidentale qui accueille la grande majorité des troupeaux de bovins (plus de huit millions de têtes pour Madagascar) est caractérisée par des feux de brousse. La pluviométrie varie de 600 à 1 400 mm/an avec cinq à sept mois secs, la température moyenne est de 26 °C.

- La région orientale possède la majorité des forêts naturelles de Madagascar. Mais leur exploitation incontrôlée, la recherche de terrains pour l'agriculture de subsistance et la pression démographique aboutissent à la déforestation rapide de ces milieux. Étant donné les fortes pentes et l'importance de la pluviométrie, cette région subit les processus d'érosion les plus actifs de l'île. Cette situation est d'autant plus alarmante que cette région représente la majeure partie du potentiel agricole du pays (vanille, café, girofle, litchi, cannelle, banane). La pluviométrie varie de 1 600 à 3 500 mm/an avec un à trois mois secs, la température moyenne est de 24 °C.

- La région méridionale connaît un climat semi-aride ; elle subit des sécheresses cycliques mettant en péril les récoltes et la survie des populations agricoles. Cette région, avec celle du nord, souffre des effets de l'érosion éolienne sur des sols sableux. La pluviométrie varie de 350 à 600 mm/an avec sept à dix mois secs, la température moyenne est de 25 °C.

Problématique forestière

À Madagascar, la forêt naturelle peu modifiée couvre 10,3 millions d'hectares et la formation naturelle dégradée 2,6 millions d'hectares. Une part importante de l'approvisionnement en bois des populations provient des formations naturelles qui sont surexploitées. Malgré les engagements de l'État et des bailleurs de fonds en faveur de la protection de l'environnement, on constate un défrichement continu des massifs forestiers naturels dans les forêts de l'ouest et de l'est. Celui-ci est estimé à 140 000 ha/an.

Dans la région des Hautes-Terres, où la couverture forestière est la plus faible, l'approvisionnement en bois des populations est assuré par les plantations d'eucalyptus et de pins. À titre d'exemple, les habitants d'Antananarivo (un million et demi d'habitants) consomment l'équivalent de deux millions de tonnes de bois ronds. Ces produits proviennent essentiellement de taillis d'*Eucalyptus robusta* plantés autour de la capitale et dans la région de Moramanga, principalement sur les axes routiers de l'est, Antananarivo-Toamasina, et du nord, Antananarivo-Anjozorobe. Dans les régions où les formations naturelles sont encore présentes (régions est et ouest), les populations utilisent principalement du bois issu des formations naturelles.

À Madagascar, la conservation des sols et les reboisements sont des préoccupations déjà anciennes (début du XX^e siècle). Pourtant, les plantations forestières ne couvrent que 316 000 ha (DGEF, 1997), ce qui est peu en regard de la situation générale du pays (besoin en bois énergie, niveau de développement).

Dans les années à venir, la croissance démographique et la diminution de la surface forestière vont accroître l'intérêt pour les plantations forestières. Les mesures de protection des forêts naturelles devraient limiter l'accès aux ressources ligneuses et, donc, augmenter l'intensité d'exploitation des plantations. Celles-ci répondent à des besoins en bois énergie, mais aussi en bois de service et en bois d'œuvre.

L'extension des surfaces plantées nécessite que l'État malgache précise de nombreux paramètres : réglementation foncière, mesures incitatives, référentiels techniques, production de semences, etc.

Situation des reboisements

La dégradation de l'environnement et des ressources naturelles avait déjà été perçue par les autorités de la monarchie dès le XVIII^e siècle et des mesures conservatoires avaient été prises pour l'environnement. L'un des soucis du roi Andriampoinimerina (1710-1790) était la conservation de la forêt naturelle. Les reboisements quelque peu importants ont débuté avec la colonisation, dès la fin du XIX^e siècle, lors de l'aménagement des axes routiers. Ils se sont poursuivis, à partir de 1910, avec la construction du chemin de fer (LOUVEL, 1952). *Eucalyptus robusta* et *E. camaldulensis* ont été plantés le long des voies de communication, au départ de Tananarive, en arbres d'alignement ou en plantations destinées à approvisionner en combustible la compagnie du chemin de fer.

Vers 1935-1940, le service forestier a encouragé les reboisements collectifs effectués sous son contrôle par les villageois. Cela a mené à constituer des périmètres unitaires de reboisement de 5 à 20 ha. Au temps de la I^{re} République (1960-1972), le reboisement a été décrété devoir national de tout citoyen. Cependant, malgré la contribution importante des populations, les produits revenaient exclusivement à l'État. À cette période, les services forestiers ont effectué les premiers reboisements industriels décrits plus loin (Haut-Mangoro et Haut-Matsiatra). Au début de la II^e République (1975), une nouvelle forme de reboisement fondée sur les travaux communautaires s'est développée. Chaque canton ou commune se devait d'entreprendre des activités de reboisement. Plus tard, pendant la période 1980-1995, le gouvernement a pris plusieurs mesures destinées à favoriser les plantations forestières. Les plus importantes ont été de céder gratuitement des plants, de créer des zones en faveur des arbres et d'offrir aux particuliers et aux groupements



L'arbre en milieu agricole dans les environs d'Antsirabe.

The tree in an agricultural environment near Antsirabe.

villageois la possibilité de s'approprier les terrains domaniaux ainsi mis en valeur. Cependant, les taux de réussite et les productivités faibles des plantations généralement observés découlaient du manque de suivi et d'entretien des plantations.

Dans le cas plus précis de la région d'Antananarivo, les paysans malgaches ont très rapidement utilisé l'eucalyptus comme essence de reboisement. Pour la plupart d'entre eux, l'intérêt résidait dans une stratégie de défense pour bloquer l'installation des colons français (BERTRAND, 1999).

Deux faits marquants caractérisent la problématique des plantations forestières. Il s'agit de l'insécurité foncière et de l'utilisation courante du feu dans les zones d'élevage bovin et dans les zones actives de culture sur brûlis.

Madagascar présente une grande variété de situations foncières locales, qui ont en commun un niveau élevé d'insécurité foncière et un développement récent et rapide des conflits fonciers, parfois violents (BERTRAND, RAZAFINDRAIBE, 1997).

Les feux de brousse sont étroitement liés à l'activité des populations locales ou migrantes et ils ont des origines diverses (défrichage, élevage bovin, conflits sociaux). La surface parcourue annuellement par les feux de brousse est officiellement de l'ordre d'un million d'hectares, mais elle peut varier de façon importante selon la précocité de la saison des pluies. Cette situation nécessite d'intégrer la résistance au passage des feux dans les critères du choix des espèces de reboisement.

Dans ce contexte, il est fréquent de rencontrer chez les paysans une perte de motivation après un ou plusieurs échecs dus aux dégâts du feu et, donc, un manque d'intérêt à s'investir encore dans les plantations forestières.

L'intervention de l'État

Les zones délimitées pour le reboisement couvrent plus d'un million d'hectares. Néanmoins, la surface réelle reboisée n'est que de 316 000 ha (DGEF, 1997). Le faible taux de reprise des plants et le passage du feu dans les jeunes plantations expliquent ces différences. Depuis 1996, l'État malgache n'intervient plus directement dans les actions de reboisement. Cependant, les reboiseurs disposent d'une quantité considérable d'informations techniques sur les plantations forestières, grâce aux résultats des travaux menés durant plusieurs décennies par les services forestiers et la recherche forestière :

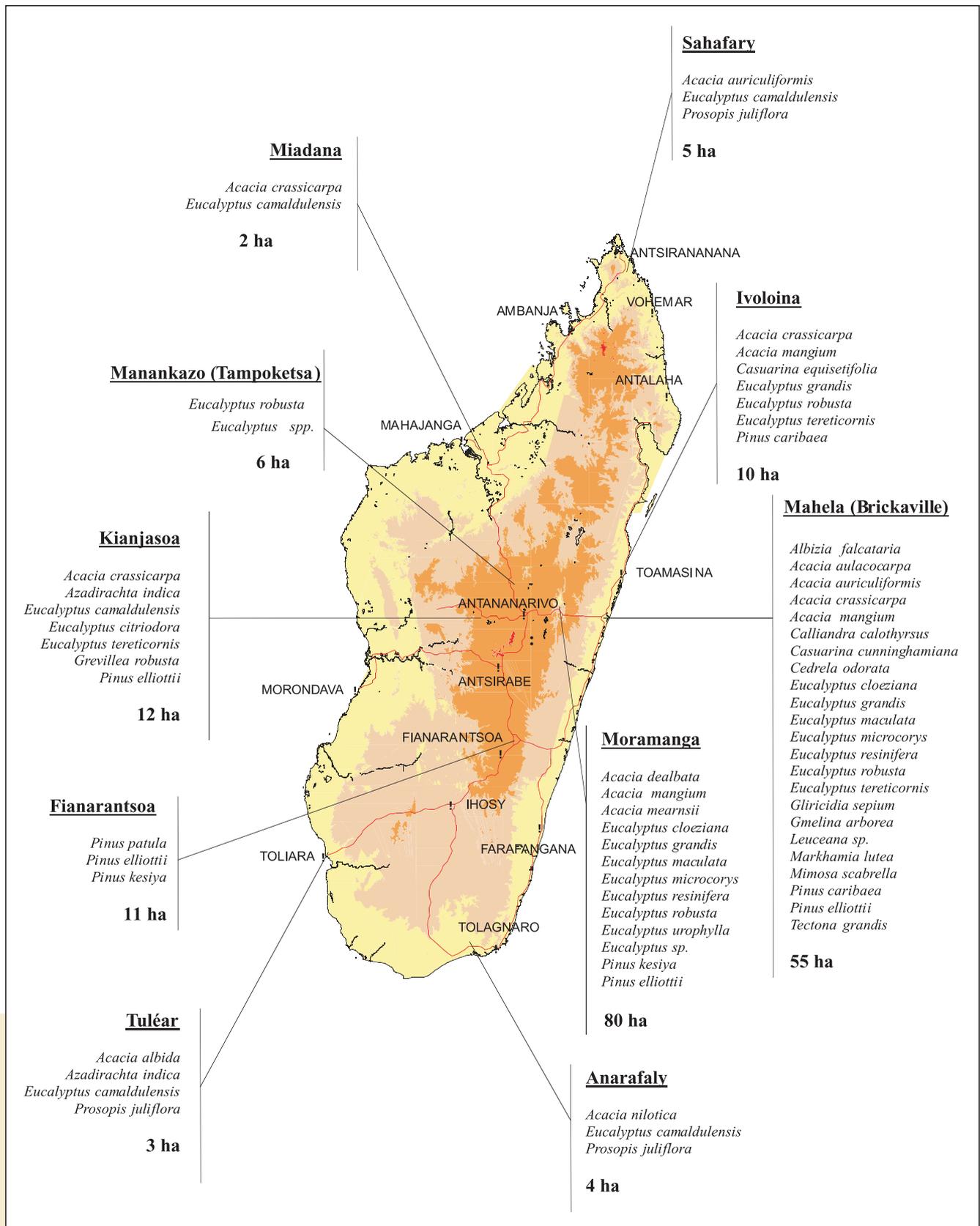
- tris d'espèces en arboretum (90 arboretums, 700 espèces) ;
- essais sylvicoles divers (écartement, densité de plantation, éclaircie, provenances-descendances) ;
- actions de sensibilisation auprès des populations rurales ;
- reboisements à grande échelle (Matsiatra : 35 000 ha ; Mangoro : 75 000 ha).

Parmi les essences testées, les pins tropicaux se sont distingués, notamment *Pinus patula* et *P. kesiya*. Dès 1960, ces deux espèces ont été les pièces maîtresses des reboisements. Elles sont destinées à convertir des zones abandonnées en terrains productifs de bois à usages multiples et à

protéger des bassins versants contre l'érosion. Le premier périmètre économique s'est ouvert, en 1960, dans la région de la Haute-Matsiatra (Fianarantsoa). Les plantations ont pris fin en 1975, après l'établissement de 35 000 ha en *P. patula*. Mais, de toutes les opérations d'enrênement engagées à Madagascar, celle de la vallée du Haut-Mangoro (Moramanga) a créé le plus vaste massif artificiel, soit environ 75 000 ha plantés, dont près de 50 000 ha en *P. kesiya*, le reste étant couvert par *P. elliotii* et *P. caribaea*. Environ 5 000 ha de terrains peu propices aux pins ont été plantés en eucalyptus (SCHMITT, RAFALY, 1997). Les travaux ont été menés par la société Fanalamanga avec des fonds de l'État malgache et de la Banque mondiale, dans le cadre d'un projet papetier. L'usine de pâte à papier n'ayant pas été construite, l'objectif de la plantation a été changé pour une production de bois d'œuvre pour le sciage et le déroulage (BOUILLET, LEFÈVRE, 1996). La région du Mangoro connaît actuellement un développement économique rapide, qui repose sur l'exploitation des plantations et la transformation du bois pour l'exportation et le marché national (exportation de bois ronds, ameublement, matériaux de construction du bâtiment, palettes). Cette région est devenue un bassin d'emploi en pleine expansion.



Culture du maïs sous des pins.
Maize crops beneath pine.

**Carte 2**

Implantation à Madagascar du dispositif de production de semences forestières du FOFIFA-DRFP/CIRAD-Forêt.

Location in Madagascar of the FOFIFA-DRFP/CIRAD-Forêt forest seed production system.

Les reboisements privés

À titre individuel, les eucalyptus ont été utilisés pour délimiter les terres nouvellement immatriculées ou en cours d'immatriculation. Et, dans le même temps, les populations rurales autour de Tananarive ont compris tout le parti économique qu'elles pouvaient tirer du bois destiné au chemin de fer. Elles ont progressivement planté des eucalyptus sur les tanety¹, en association avec le riz irrigué dans les bas-fonds. Au début du siècle dernier, le combustible domestique habituel à Tananarive était le bozaka². Le bois et le charbon de bois, initialement utilisés par la population aisée, ont progressivement pris le relais dans l'ensemble de la population. Dans les zones nord et est d'Antananarivo, les plantations d'eucalyptus représentent, à l'heure actuelle, la majeure partie du revenu des ménages ruraux.

La surface totale couverte par les eucalyptus atteint actuellement 147 000 ha (RANDRIANJAFY, comm. pers.), dont plus des deux tiers sont privés. L'extension des plantations privées se poursuit du fait d'une nécessité économique dans les zones de production (Manjakandriana et Anjozorobe). De préférence aux zones occidentales d'Antananarivo, l'extension des plantations intervient autour de ces deux agglomérations. Elle est motivée par la présence d'axes routiers et par un climat relativement plus humide, dû à l'influence des alizés. *Eucalyptus robusta* est la principale espèce rencontrée dans ces peuplements ; cette espèce rejette vigoureusement, même après le passage du feu, et elle se contente de sols peu fertiles. Mis à part cette région, l'extension des reboisements est influencée par les activités menées par divers projets et ONG. Grâce à la méthode participative, les populations sont totalement impliquées dans les actions de reboisement, depuis la production des plants jusqu'à l'entretien des plantations. Les opérations de « reboisement paysan » les plus importantes reviennent aux actions

développées par l'Association nationale d'actions environnementales (ANAE), qui apporte les financements nécessaires aux opérateurs. Elles ont concerné 17 000 ha lors du Programme environnemental 1 (1993-1997), et 32 000 ha sont prévus (ANAE, 1998) dans le cadre du Programme environnemental 2 (1998-2002).

Le rôle de la recherche forestière

À Madagascar, la recherche forestière en matière de plantation est menée principalement par le DRFP (Département des recherches forestières et piscicoles) de la FOFIFA (Centre national de recherche appliquée au développement rural), appuyé par le CIRAD-Forêt. Les actions actuelles bénéficient des résultats obtenus dans les nombreux arboretums installés dans les années 1940-1960. À l'issue d'un premier tri sévère effectué dans ces arboreta, la recherche forestière s'est appliquée à déterminer les espèces les mieux adaptées et les plus productives dans le contexte des reboisements malgaches (GACHET, 1968 ; SUTTER, RAKOTONOELY, 1989). Dans les années 70, plusieurs essais spécifiques ont ainsi été mis en place dans les zones potentiellement destinées au reboisement (Haute-Matsiatra, Haut-Mangoro, région des Tampoketsa, Brickaville ; carte 2).

Une dizaine d'espèces (*E. robusta*, *E. grandis*, *E. cloeziana*, *E. resinifera*, *E. camaldulensis*, *E. microcoris*, *E. maculata*, *E. pilularis*, *P. kesyia*, *P. caribaea*, *P. eliottii*, *P. patula* et *P. oocarpa*) ont présenté des caractéristiques intéressantes (croissance en hauteur, production en volume) dans les conditions climatiques et pédologiques de Madagascar.

Pour ces espèces sélectionnées, les essais provenances-descendances (installés dans les années 80) ont permis d'étudier la variabilité intraspécifique et de comparer les provenances locales avec celles introduites (BOUVET, ANDRIANIRINA, 1990). Ces dernières ont été plus performantes en termes d'adaptation et de productivité. Les provenances locales présentent, souvent, les effets dépressifs de la consanguinité (perte de croissance en hauteur). Les activités de la recherche forestière durant ces vingt dernières années se sont essentiellement réalisées dans la région du Haut-Mangoro.

¹ Tanety : colline.

² Bozaka : combustible constitué de graminées.

Production de bois de feu pour la ville d'Antananarivo dans la région de Manjakandriana.

Fuelwood production for the town of Antananarivo in the Manjakandriana region.



Contexte actuel de production et de diffusion des semences

Analyse des besoins et choix des espèces

La croissance des espèces autochtones de Madagascar étant très lente, le choix des forestiers s'est porté sur des espèces exotiques à croissance rapide. Les genres *Eucalyptus* et *Pinus* se sont distingués en raison de leur rusticité et de leur croissance rapide. La synthèse des résultats des divers essais, combinée à une analyse des résultats obtenus en arboretum, a permis de dresser une liste d'espèces adaptées aux plantations (DRFP, 1990 ; JÜRGEN *et*

al., 1993). Cette liste est proposée aux acteurs du reboisement depuis plus de vingt ans. L'étude des ventes de graines forestières réalisées par le Silo national des graines forestières (SNGF) a permis d'identifier les espèces les plus demandées, qui correspondent aux espèces conseillées. Une trentaine d'espèces représente plus de 90 % des besoins en matière de reboisement.

Étant donné la situation actuelle (économique, environnementale), la place de l'eucalyptus à Madagascar, les acquis techniques accumulés, il n'est pas question d'ouvrir, ici, le débat sur le choix des espèces exotiques, en particulier sur les eucalyptus. On constate simplement que, dans toute l'île, l'intérêt des populations, qui est à respecter avant tout autre, porte sur les espèces à croissance rapide comme l'eucalyptus. Les

raisons sont évidentes : l'existence d'un marché pour ce bois (charbon, perche, poteau, planche), la croissance rapide, les produits multiples, la capacité à rejeter, les qualités technologiques, la résistance au passage du feu, etc.

Cependant, étant donné les problèmes de conservation des sols, les acacias, légumineuses qui fixent l'azote atmosphérique, intéressent de plus en plus les acteurs du développement. Les premiers essais ne datent que de 1984.

Les principales caractéristiques retenues pour le choix des espèces et pour les sélections effectuées dans les vergers à graines dépendent du comportement de ces espèces, sachant qu'une espèce ne peut répondre, à la fois, à toutes les attentes. Selon les objectifs du reboisement (protection des sols, production de

Tableau I

Type de source de graines pour les espèces principales inscrites au catalogue national (les espèces sont citées au plus haut niveau d'amélioration)

Type de source de graines	1	2	3	4
Connaissance de la variabilité	non	oui	oui	oui
Sélection effectuée	non	non	oui	oui
Production testée	non	non	non	oui
Espèces	<i>Adansonia digitata</i> <i>Albizia chinensis, A. procera</i> <i>Araucaria angustifolia</i> <i>Bismarckia nobilis</i> <i>Calophyllum inophyllum</i> <i>Cassia leiandra, nodosa, siamea, spectabilis</i> <i>Cotoneaster franchetii</i> <i>Cordyla madagascariensis</i> <i>Colvillea racemosa</i> <i>Dalbergia purpurascens</i> <i>Delonix adansonoides, regia</i> <i>Dodonea madagascariensis, repens</i> <i>Syzygium cumini (Eugenia jambolona)</i> <i>Grevillea banksii</i> <i>Harungana madagascariensis</i> <i>Hernandia voyronii (Hazomalania voyronii)</i> <i>Intsia bijuga</i> <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Melaleuca leucadendra</i> <i>Neobeguea mahafaliensis</i> <i>Phyllarthron madagascariense</i> <i>Podocarpus gaussenii</i> <i>P. madagascariensis</i> <i>Terminalia mantaly</i> <i>Tamarindus indica</i> <i>Thuya orientalis</i>	<i>Acacia dealbata</i> <i>Acacia galpinii</i> <i>Acacia leptocarpa</i> <i>Albizia lebbeck, gummifera, falcata</i> <i>Anacardium occidentale</i> <i>Azadirachta indica</i> <i>Callitris calcarata, rhomboïdes</i> <i>Canarium madagascariense</i> <i>Casuarina cunninghamiana</i> <i>Toona sinensis (Cedrela sinensis)</i> <i>Cupressus arizona, lusitanica, pyramiladis, torulosa</i> <i>Eucalyptus saligna</i> <i>Eucalyptus torrelliana</i> <i>Gliricidia sepium</i> <i>Khaya madagascariensis</i> <i>Khaya senegalensis</i> <i>Liquidambar styraciflua</i> <i>Tectona grandis</i> <i>Terminalia superba</i>	<i>Acacia albida</i> <i>Acacia aulacocarpa</i> <i>Acacia auriculiformis</i> <i>Acacia crassicaarpa</i> <i>Acacia mangium</i> <i>Acacia mearnsii</i> <i>Acacia nilotica</i> <i>Casuarina equisetifolia</i> <i>Casuarina cunninghamiana</i> <i>Eucalyptus camaldulensis</i> <i>Eucalyptus citriodora</i> <i>Eucalyptus cloeziana</i> <i>Eucalyptus grandis</i> <i>Eucalyptus robusta</i> <i>Eucalyptus microcorys</i> <i>Eucalyptus resinifera</i> <i>Eucalyptus maculata</i> <i>Eucalyptus tereticornis</i> <i>Gmelina arborea</i> <i>Grevillea robusta</i> <i>Prosopis juliflora</i> <i>Pinus caribaea</i>	<i>Eucalyptus grandis</i> <i>Eucalyptus robusta</i> <i>Pinus elliottii</i> <i>Pinus kesiya</i> <i>Pinus patula</i>

bois de feu, de perches ou bois de service...), on privilégiera un caractère plutôt qu'un autre :

- la croissance juvénile forte, afin de s'affranchir du recrû ou des feux courants pour les espèces résistantes au feu ;

- la capacité à rejeter, qui permet d'obtenir des taillis et de faire plusieurs rotations ;

- la rusticité, qui rend possible une production correcte sur des sols peu fertiles ;

- l'homogénéité dans la croissance et la forme des arbres ;

- la production d'une litière peu abondante, qui limite l'impact des feux courants.

Une structure viable de production et de distribution

C'est en 1969 qu'a été créé le service des graines au sein de la Direction des eaux et forêts. Depuis 1988, ce service reçoit le concours du Projet d'appui au silo national de la Coopération suisse. En 1992, il a été transformé en établissement public à caractère industriel : le Silo national des graines forestières (SNGF). Cet établissement a rapidement évolué vers une structure financièrement autonome : 38 % d'autofinancement en 1992, 90 % en 1997 (SNGF, 1999 a). L'objectif actuel de cet organisme est d'assurer la production de graines forestières de qualité, en intégrant la demande des opérateurs du reboisement. Un soin particulier est apporté dans le choix des parcelles semencières quand il n'existe pas de verger à graines (hauteur dominante, forme des arbres, éclaircies sélectives, etc.). Le SNGF contribue à gérer les ressources génétiques forestières, aussi bien des espèces exotiques que des espèces autochtones. Sa zone d'action est nationale.

Avant 1989, la plupart des projets de reboisement à Madagascar importaient les graines forestières. Actuellement, le SNGF vend plus de quatre tonnes de semences d'une cinquantaine d'espèces, dont 250 à

350 kg pour les eucalyptus, à plus de 350 utilisateurs. Il couvre près de 100 % des besoins nationaux. Les efforts de communication (publicité dans la presse locale et sur le site Internet) favorisent l'exportation de semences dans une vingtaine de pays, allégeant ainsi les coûts de production (SNGF, 1999 a).

Production de graines

Le réseau de production de graines est hétéroclite. Il a longtemps été constitué par les essais sylvicoles ou de plantation, installés par le Service des eaux et forêts, qui ont été transformés en parcelles semencières. Ensuite, les essais de recherche ont permis d'étoffer ce réseau. Actuellement, le FOFIFA, associé au CIRAD-Forêt et au SNGF, a mis en place des vergers à graines destinés à produire des semences de meilleure qualité. Le dispositif de production couvre tout le territoire national. Les parcelles semencières sont répertoriées dans un catalogue national. Elles se répartissent dans les quatre catégories de matériel forestier de reproduction, suivant les normes du système de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économique) pour le contrôle des matériels forestiers de reproduction. Le tableau I présente la répartition selon ces catégories des soixante-douze espèces :

1. matériels identifiés issus de peuplements identifiés et délimités : 26 espèces ;

2. matériels sélectionnés issus de peuplements ayant subi une sélection phénotypique individuelle : 19 espèces ;

3. matériels qualifiés provenant de plantations issues de graines (vergers à graines de semis ou de familles) ou de boutures (verger mono ou polyclonal) : 22 espèces ;

4. matériels testés issus de peuplements, de plantations de graines, de vergers à graines, de vergers de familles, de clones ou de mélange clonal : 5 espèces.



Production de planches d'eucalyptus à Madagascar.
Production of eucalyptus planks in Madagascar.

Parcelles de production des programmes de recherche

Problématique

L'origine du matériel végétal introduit à Madagascar est souvent inconnue et la base génétique est probablement étroite. La fécondation croisée permet aux espèces forestières (le plus souvent allogames) d'éviter les effets héréditaires négatifs (gènes létaux). Le croisement préférentiel entre des individus apparentés augmente la consanguinité et l'apparition de caractères non souhaités ainsi que la mortalité. Les variétés issues des peuplements existants sont, donc, moins productives et présentent les effets de la consanguinité : croissance plus faible, mauvaise adaptation (LEBOT, RANAIVOSON, 1994). L'utilisation de telles variétés peut compromettre le succès des plantations. Le risque est grand de voir les reboiseurs se décourager et la dégradation de l'environnement s'accroître, freinant ainsi le développement de la filière bois et le développement rural.

L'objectif du programme sur les espèces exotiques de feuillus et de pins était d'étudier, dans un premier temps, la variabilité intraspécifique des espèces prioritaires. Cette étude est menée dans plusieurs zones bioclimatiques de Madagascar. Des essais comparatifs de provenances sont

mis en place et évalués pour chaque espèce. Une synthèse des résultats obtenus par le programme a permis d'élaborer une stratégie d'amélioration adaptée au cas de Madagascar (diversité climatique, objectifs, moyens...). Le FOFIFA a reçu, entre 1993 et 1998, un appui financier du Fonds européen de développement.

Objectif

L'installation de vergers à graines est une étape essentielle dans le cadre de la stratégie d'amé-

lioration à long terme. Cette étape concerne principalement la foresterie villageoise et, dans une moindre mesure, la foresterie industrielle. Il s'agit d'améliorer simultanément une vingtaine d'espèces de feuillus dans les quatre zones bioclimatiques du pays ainsi que cinq espèces de pins tropicaux. L'objectif est de produire des variétés plastiques, rustiques, à croissance juvénile forte et destinées à des usages multiples. Les variétés doivent être distribuées sous la forme de graines.

Il a été décidé de produire des variétés synthétiques par pollinisation libre dans la région d'utilisation. Les dispositifs de reproduction de ces vergers doivent permettre de se rapprocher d'une panmixie. Théoriquement, ils visent à réduire les risques d'autofécondation et à favoriser les croisements interprovenances ou interfamilles. L'introduction d'une importante variabilité génétique est fondamentale. Les provenances introduites sont généralement originaires de l'aire naturelle de l'espèce consi-

Tableau II

Nombre de provenances et de descendance par site introduites depuis ces dix dernières années dans le cadre des travaux de la recherche forestière

	Fianarantsoa	Anarafaly	Ivoloina	Kianjasoa	Mahela	Miadana	Moramanga	Sahafary	Tuléar
<i>Acacia albida</i>									6 92
<i>Acacia aulacocarpa</i>					9 63				
<i>Acacia auriculiformis</i>					18 158			5 65	
<i>Acacia crassicarpa</i>			9 294	9 294	20 379				
<i>Acacia mangium</i>			12 100		12 100		11 201		
<i>Acacia nilotica</i>		8 164							
<i>Azadirachta indica</i>		5 140		3 84					2 28
<i>Calliandra calothyrsus</i>					12 Inc				
<i>Casuarina equisetifolia</i>			8 105						
<i>Casuarina cunninghamiana</i>					5 45				
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>		21 150		6 55		6 55		5 66	5 45
<i>Eucalyptus maculata</i>					10 84		9 73		
<i>Eucalyptus grandis</i>			4 13		9 80				
<i>Eucalyptus robusta</i>					22 229		16 153		
<i>Eucalyptus tereticornis</i>			21 329	3 32	20 388				
<i>Eucalyptus citriodora</i>				4 90					
<i>Eucalyptus cloeziana</i>					15 167		6 39		
<i>Eucalyptus microcorys</i>					16 131		12 129		
<i>Eucalyptus muelleriana</i>							8 69		
<i>Eucalyptus resinifera</i>					14 96		12 124		
<i>Grevillea robusta</i>				7 33					
<i>Gmelina arborea</i>					1 50				
<i>Cedrela odorata</i>					17 200				
<i>Pinus caribaea</i>			8 Inc		8 Inc		19 Inc		
<i>Pinus elliottii</i>							10 Inc		
<i>Pinus oocarpa</i>					15 Inc		17 Inc		
<i>Pinus patula</i>	17 inc						9 Inc		
<i>Prosopis juliflora</i>		5 76						5 71	6 91

Inc : données inconnues ; en gras, nombre de provenances ; en romain, nombre de descendance.

dérée. Elles sont retenues en fonction des conditions climatiques du site d'implantation et de la disponibilité en semences. Le nombre de semenciers dans les lots de graines importés est un critère de choix (tableau II). Le dispositif expérimental est élaboré de manière à évaluer, dans un premier temps, la variabilité intraspécifique de l'espèce. La transformation de la parcelle en verger à graines s'effectue par éclaircies successives.

Selon les sites et les espèces, la densité initiale est comprise entre 150 (7 x 7 m) et 4 444 (1,5 x 1,5 m) tiges par hectare. Les éclaircies sélectives sont menées de telle sorte que les meilleurs individus de chaque provenance soient conservés. Par ordre croissant, les critères de sélection utilisés reposent sur l'état sanitaire, la conformation et la croissance. La densité finale d'un verger à graines est comprise entre 150 et 250 tiges par hectare. Pour les feuillus, l'étape suivante consiste à créer une nouvelle population d'amélioration à partir des descendances (familles de demi-frères) d'arbres « plus » sélectionnés dans les essais. Pour les pins, le programme diffère puisque le schéma d'amélioration comprend la mise en place de vergers à graines de clones.

Résultats

Les activités du programme de recherche ont introduit de cette façon 60 provenances qui concernent cinq espèces de pins et 300 provenances pour vingt-cinq espèces de feuillus (carte 2). Le dispositif mis en place ces dernières années regroupe la production de graines sur quelques sites, en l'occurrence les stations de recherche du FOFIFA.

Le dispositif de vergers à graines forestières permet au pays d'être quasiment autonome en matière de semences forestières. À titre d'exemple, les graines d'acacias australiens, auparavant importées à des coûts prohibitifs, sont maintenant disponibles en quantité suffisante (CHAIX *et al.*, 1999). Depuis 1997, les vergers installés par le FOFIFA et le CIRAD-Forêt approvisionnement, de plus

en plus, le marché des semences forestières à travers la commercialisation du Silo national des graines forestières (SNGF, 1999 b) : acacias australiens à 90 %, pins à 50 % et eucalyptus à 15 %. Notons que la plupart des vergers à graines ont moins de cinq ans et que les travaux de sélection se poursuivent.

Pour les résineux, le programme d'amélioration génétique du FOFIFA a reçu l'appui de la Coopération suisse à travers le SNGF. À partir d'essais de provenances, la stratégie repose sur la sélection d'arbres d'élite et leur multiplication végétative pour mettre en place des vergers à graines de clones (NANSON, 1972). Dans le cadre de ce programme, plus de 130 ha de parcelles expérimentales (essais de provenances, essais de descendances) et de vergers à graines ont été installés (RAKOTOVAO *et al.*, 1996 ; RAKOTOMANAMPISON, VERHAEGEN, 1980). Le verger à graines de clones de *Pinus kesyia* (20 ha), installé en 1984, produit des semences depuis cinq ans. Les vergers de *Pinus patula*, *P. elliotii* et *P. caribaea* établis récemment ne sont pas encore productifs.

Analyse de la filière et perspectives pour le reboisement

À Madagascar, la plantation d'espèces à croissance rapide est une préoccupation ancienne, mais toujours d'actualité. La quantité de graines vendues (250 kg annuellement pour les eucalyptus, par exemple) est sans commune mesure avec les plantations effectivement mises en place (tableau III). La production de plants de qualité montre encore des lacunes, souvent et à tort la qualité des graines est mise en cause. Auparavant, celle-ci pouvait être discutée, mais des efforts importants ont été réalisés aussi bien pour la qualité des semences forestières que pour la diffusion de celles-ci.

Tableau III

Vente annuelle nationale du Silo national des graines forestières (SNGF) par groupe d'espèces (kg) et surface potentielle de reboisement pour l'année 1999 (SNGF, 1999 b, 2000)

Espèces	Vente annuelle nationale du SNGF (kg)			Surface (ha)
	1997	1998	1999	
Acacia	-	60	40	600
dont <i>A. mangium</i>		32		
Eucalyptus	170	221	269	26 000
dont <i>E. robusta</i>		111	125	12 000
<i>E. camaldulensis</i>		62	81	8 000
<i>E. citriodora</i>		20	35	500
Teck	-	168	60	20
Autres feuillus	64	335	131	30
Pins et résineux	125	180	134	120
Espèces agroforestières	1 110	1 578	2 423	2 500
Totaux	1 469	2 542	3 057	29 270

La surface en hectares est estimée comme suit : $S = (\text{densité [graines/kg]} \times \text{vente 1999 [kg]} \times 0,75 [\text{pouvoir germinatif moyen}] \times 0,5 [\text{on suppose que les pertes en plants sont de 50 \%}]) / 2\ 500 \text{ plants à l'hectare à la plantation.}$

Les mesures d'accompagnement

La politique en matière d'environnement est en pleine évolution à Madagascar. Il est intéressant de retracer les différentes politiques adoptées pour les reboisements. Le SNGF est d'ailleurs, à la demande du ministère des eaux et forêts, l'un des acteurs majeurs de l'élaboration et de la définition des politiques forestière et environnementale.

Adhésion au système de l'OCDE

L'OCDE propose aux gouvernements de ses pays membres un cadre pour examiner, élaborer et perfectionner les politiques économiques et sociales. A l'initiative du SNGF, Madagascar a adhéré, en 1998, au système de l'OCDE, qui régleme par des lois, des décrets et des accords internationaux le commerce du matériel de reproduction forestier dans les pays membres. En adoptant ces critères, Madagascar peut faire état d'un label de qualité qui lui ouvre des marchés extérieurs. Les normes qui s'appliquent aux activités de récolte et de commercialisation des graines forestières à l'échelle nationale doivent également être en vigueur sur le marché local. Elles contraignent donc l'ensemble des intervenants de ce secteur et contribuent à améliorer la qualité des semences commercialisées.

Verger à graines de *Prosopis juliflora* âgé de 2 ans et demi. Station de Tuléar.
Tree seed orchard for *Prosopis juliflora* aged 2,5 years. Tuléar station.



Objectifs de la nouvelle politique forestière

Dans un contexte caractérisé par une forte dégradation des ressources forestières, un recul de l'autorité de l'administration publique, une baisse de responsabilité des acteurs et un potentiel économique insuffisamment mis en valeur, la politique forestière malgache a été redéfinie en 1997.

Cette nouvelle politique forestière comprend quatre grandes orientations, dont l'un des objectifs est d'augmenter la superficie et le potentiel forestiers pour que la forêt puisse mieux remplir, à long terme, ses fonctions économiques, écologiques et sociales. Elle consiste à instaurer un environnement favorable aux initiatives en matière de reboisement, assurer la sécurité foncière aux reboiseurs, orienter les reboisements en fonction des besoins régionaux ou locaux et intensifier les actions liées à l'aménagement des bassins versants. Pour atteindre ces objectifs, la nouvelle politique est accompagnée d'une loi forestière, dont un décret d'application sur le reboisement vient de sortir.

Politique environnementale

La charte de l'environnement, adoptée en 1990, vise à établir un équilibre harmonieux entre les besoins de développement de l'homme et les risques écologiques. L'un des objectifs de cette politique est de promouvoir un développement durable, équitable et bien réparti sur le territoire national en gérant au mieux les ressources naturelles. Il s'agit en l'occurrence de mieux valoriser à l'échelle locale les ressources naturelles (reboisement, agroforesterie, conservation des sols, réduction de la pollution des eaux) et de s'assurer que les investissements du secteur assurent la pérennité du développement sans porter préjudice aux ressources naturelles.

Politique de développement rural

Concernant le secteur forestier de la politique nationale de développement rural adoptée en 1994 et suivie par le Plan d'action de développement rural (PADR), les objectifs spécifiques liés au reboisement sont les suivants :

- accroître les superficies boisées ;
- définir un plan d'aménagement des bassins versants pour prévenir l'ensablement des rizières ;
- renforcer la mise en application de la réglementation sur les zones naturelles protégées ;
- satisfaire la demande en combustibles domestiques.

La stratégie et le plan d'actions consistent à :

- intensifier les opérations de reboisement par les pépinières forestières privées et la promotion des reboisements villageois et communautaires ;
- inciter et appuyer les reboisements communautaires à caractère économique (pour la fourniture de combustible domestique) et de protection ;
- poursuivre les actions de plantation dans les périmètres communautaires, avec la jouissance du droit de propriété individuelle.

Perspectives

Trois grandes orientations ont été proposées pour dynamiser le secteur du reboisement. Elles sont à la base de l'élaboration d'un décret d'application de la loi forestière pour le reboisement :

- proposition de mesures incitatives, afin de créer un environnement favorable, notamment la sécurisation foncière ;
- mise en place de plans d'actions régionaux en matière de reboisement, conçus à l'échelle régionale, qui intégreront les spécificités de chacune des régions de Madagascar ;
- proposition de mesures d'accompagnement aux opérateurs privés du secteur forestier, en favorisant notamment la professionnalisation

de ce secteur (au moins pour la production de plants).

En matière de recherche forestière, il y a lieu de poursuivre les travaux engagés durant les sept dernières années jusqu'à l'entrée en production de tous les vergers à graines. Les activités de recherche et de développement devront porter sur l'évaluation en milieu réel des variétés produites, l'amélioration du dispositif de production et de sa couverture géographique. Le travail de sélection sur les quelques espèces prioritaires est à poursuivre ainsi que l'aide au développement des reboisements de qualité.

Vergers à graines d'*Eucalyptus maculata*.
Station de Mahela.
Eucalyptus maculata seed orchard.
Mahela station.

Conclusion

Madagascar se doit d'étendre les surfaces reboisées par le biais des plantations forestières, afin de stopper la dégradation de son environnement, et d'assurer l'approvisionnement en bois aussi bien des populations rurales que des populations urbaines.

Notons également que le maintien de la production des rizières (1,5 million d'hectares) passe par la protection des bassins versants visant à limiter l'ensablement des bas-fonds.

En matière de bois énergie, la production annuelle en charbon de bois, de l'ordre de 0,6 million de tonnes, représente l'équivalent de dix millions de mètres cubes de bois.

À cela, il faut ajouter les cinq millions de mètres cubes de bois de feu utilisés annuellement. Si l'on estime à 10 m³/ha/an la productivité des 316 000 ha de peuplements artificiels, les formations naturelles fournissent au moins les quatre cinquièmes des besoins nationaux en bois énergie.

Le reboisement actuel, entre 2 000 et 3 000 ha/an, est trop faible en regard des estimations fondées sur les ventes de semences (environ 30 000 ha annuellement). De gros efforts restent à faire pour optimiser l'utilisation des semences : techniques sylvicoles, production de plants, entretien et protection des plantations. Ces reboisements sont encore insuffisants pour alléger la pression d'exploitation sur les formations naturelles. Il est urgent de mettre en œuvre et d'appliquer les nouveaux textes des différentes politiques élaborées afin d'accroître les surfaces plantées.

Dans cet esprit, le gouvernement malgache, avec les bailleurs de fonds, a redéfini sa politique de développement visant à favoriser la protection de l'environnement et à promouvoir les reboisements. Le service forestier et la recherche forestière ont établi des priorités et élaboré une stratégie destinée à accroître les surfaces reboisées. Le dispositif de production de semences forestières mis en place par la recherche couvre quasiment les besoins nationaux. L'augmentation du nombre de clients nationaux et internationaux du Silo national des graines forestières traduit une demande croissante, qu'il importe de satisfaire. Les travaux de la recherche forestière fournissent les connaissances nécessaires au reboisement, ainsi qu'une garantie de qualité du matériel végétal fourni.

Néanmoins, il convient d'améliorer la diffusion des résultats et l'appui technique aux reboiseurs. L'objectif est de valoriser au mieux les nombreux résultats pour concourir au développement des zones rurales et à l'amélioration du niveau de vie des populations concernées.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANAE (Association nationale d'actions environnementales), 1998. Mini-projets de conservation des sols et d'amélioration du cadre de vie rurale. Association nationale d'actions environnementales, Madagascar, 21 p.

DGEF (Direction générale des eaux et forêts), 1997. Inventaire écologique forestier national. Ministère des eaux et forêts, 146 p.

BERTRAND A., 1999. La dynamique séculaire des plantations d'eucalyptus sur les Hautes-Terres malgaches. *Le Flamboyant*, 49 : 45-48.

BERTRAND A., RAZAFINDRAIBE M., 1997. L'insécurité foncière : un des premiers obstacles au développement de Madagascar. *In* : Colloque international : politique des structures et action foncière. La Réunion, Saint-Denis, 24-25 novembre 1997, 5 p.

BOUILLET J.-P., LEFÈVRE M., 1966. Influence des éclaircies de rattrapage sur la forme du tronc de *Pinus kesiya*. *Bois et forêts des tropiques* 248 : 17-30.

BOUVET J.-M., ANDRIANIRINA O., 1990. *L'Eucalyptus grandis* à Madagascar. Potentialités et orientation du programme d'amélioration génétique. *Bois et forêts des tropiques* 226 : 5-20.

DRFP, 1990. Introductions d'espèces exotiques à Madagascar. Projet inventaire des ressources ligneuses, 7 volumes, 1 200 p.

CHAIX G., RAZAFIMAHARO V., RAZAFIMAHATRATRA A. *et al.*, 1999. Projet création de vergers à graines forestières (FED 6 ACP MAG 84). Rapport final du projet, FOFIFA-DRFP, CIRAD-Forêt, 200 p.

GACHET C., 1968. Les essences de reboisement à Madagascar : premiers résultats des essais effectués en arboretum et en reboisement intensif. CTFT Madagascar, 17 p.

JÜRGEN J., RAJOELISON G., TSIZA G. *et al.*, 1993. Choix des essences pour la sylviculture à Madagascar. Bulletin du département des eaux et forêts de l'ESSA, Akon'ny Ala, numéro spécial, décembre 1993, 166 p.

LEBOT V., RANAIVOSON L., 1994. *Eucalyptus* genetic improvement in Madagascar. *Forest Ecology and Management*, 6 : 135-152.

LOUVEL M.M., 1952. Les reboisements. Bulletin de l'Académie Malgache, numéro spécial du cinquantenaire, 43-45.

NANSON, 1972. Programme d'amélioration des essences forestières à Madagascar. FAO : SF/MAG 8, rapport technique n° 8, FAO-PNUD, Rome, Italie, 43 p.

RAKOTOMANAMPISON A., VERHAEGEN D., 1980. Essais d'introduction des résineux à Madagascar. Synthèse des résultats obtenus sur les essais installés par le DRFP depuis 1969. FODIFA-DRFP n° 469, 34 p.

RAKOTOVAO Z., RAKOTONDRAOELINA H., RASAMIMANANA A., 1996. Bilan de 20 années de recherche en génétique forestière. FOFIFA-DRFP n° 721, Antananarivo, Madagascar, 58 p.

SCHMITT L., RAFALY N., 1997. Bilan d'essais sylvicoles sur *Pinus kesiya* dans la région du Haut-Mangoro (Madagascar). FOFIFA, ministère des affaires étrangères, 149 p.

SNGF, 1999 a. Bilan de la phase 4 du projet d'appui au SNGF. Ministère des eaux et forêts, Antananarivo, Madagascar, 13 p.

SNGF, 1999 b. Rapport annuel 1998. Ministère des eaux et forêts, Antananarivo, Madagascar, 31 p.

SNGF, 2000. Rapport annuel 1999. Ministère des eaux et forêts, Antananarivo, Madagascar, 28 p.

SUTTER E., RAKOTONOELY, 1989. Projet inventaire des ressources ligneuses. CTFT, FOFIFA, 23 p.

Eucalyptus (à gauche) ou acacias (à droite). Les paysans malgaches s'interrogent sur le meilleur choix à faire.

Eucalyptus (left) or acacia (right). Madagascar farmers decide on the best possible choice.



Synopsis

SEED PRODUCTION FOR MADAGASCAN AFFORESTATION

Gilles CHAIX,
Lolona RAMAMONJISOA

Forest in Madagascar covers an area of 8.8 million hectares, i.e. approximately 15% of the land and is primarily composed of natural forest with 316 000 ha of plantations. More than 4/5ths of the timber supplied to the population is derived from natural forest. Forests both in the west and the east are subject to continual clearing of natural wood formations (140 000 ha annually). Some small-scale afforestation efforts were started with colonization at the beginning of the 20th century when major roads and rail networks were constructed. Since species native to Madagascar grow very slowly, forest engineers have chosen non-native species for afforestation. Eucalyptus and pine are particularly suitable because of their hardiness and rapid growth. Madagascar farmers, particularly those in the high-altitude regions, generally acquire eucalyptus. The land area covered by this tree has now reached 147,000 ha. This cover continues to increase through economic necessity in certain production areas (north-east of Antananarivo, south of Manjakandriana). To these eucalyptus plantations should be added the afforestation undertaken with coniferous species. The first land area opened in the Upper Matsiatra area covered an initial surface area of 35 000 ha, hitherto almost entirely unused. The other mountainous area, i.e. Upper Mangoro, covers 75 000 ha and has been in production for five years. Future extensions of areas planted for afforestation require the establishment of priorities, particularly as concerns the supply of good quality seed.

Efforts made to improve forest seed production

The seed section of the Forestry and Waterways Department was founded in 1969. In 1986, it was transformed into a public establishment with an industrial character, i.e. the forest seed Silo (SNGF) whose objective is to ensure the production of high-quality forest seed.

FOFIFA genetic improvement programs began with a study of the intraspecific variability of the priority species. This study was conducted in several different bioclimatic zones of Madagascar. The programs concern approximately 20 deciduous species and five tropical pines. The strategy implemented aims to produce plastic, hardy species with rapid early growth intended for a multitude of purposes. The varieties must be distributed in the form of seed, i.e. produced by sexed means. The installation of tree seed orchards constitutes an essential step in this long-term improvement strategy.

Prior to 1989, most afforestation projects in Madagascar relied on imported forest seed, or generated the seeds themselves. Currently, SNGF markets more than 4 tonnes of seed for approximately 50 species, including 250-350 kg of eucalyptus seed, to more than 350 users. The production network has been built up through forestry research efforts or through plantations initially created by the Forestry and Waterways Department then subsequently transformed into production plots. This network was then further supplemented by research efforts.

Madagascar development policies

Madagascar forestry policy was redefined and adopted in 1997. It is based on the four main initiatives listed below:

- establishment of an environment favorable to afforestation initiatives ;
- establishment of land safety for those afforestation;
- planning of afforestation efforts to meet local and regional needs;
- intensification of efforts made to develop the catchment basin.

The environmental charter adopted in 1990 aimed to re-establish a sustained and harmonious equilibrium between man's developmental needs and ecological risk. Here, this concerns more particularly the local use of natural resources (afforestation, agroforestry, soil conservation).

As regards the forest sector of the national policy for rural development, adopted in 1994, the specific objectives in terms of afforestation consist of:

- increasing forest-bearing land areas;
- definition of a plan for the development of the catchment basin;
- meeting the demand for household combustibles.

Madagascar must extend its forest plantations. If it does not, environmental degradation may well continue and rural and urban populations will no longer be guaranteed adequate supplies of timber. Annual fuelwood production is approximately 15 million tonnes. Natural forest formations provide at least 4/5ths of national needs. Considerable efforts are still required to optimize seed use: forestry techniques, plant production, and protection and maintenance of plantations.

Although the forest seed production system in place today is able to meet national needs, the results should be more widely disseminated and those involved in afforestation should be provided with technical support. The objective here is to promote the development of rural areas and the living standards of the populations concerned.

BORRINI-FEYERABEND G., FARVAR M.T., NGUINGUIRI J.C., NDANGANG V.A., 2000. **CO-MANAGEMENT OF NATURAL RESOURCES: ORGANISING, NEGOTIATING AND LEARNING BY DOING.** GTZ, IUCN, KASPAREK VERLAG, 95 P.



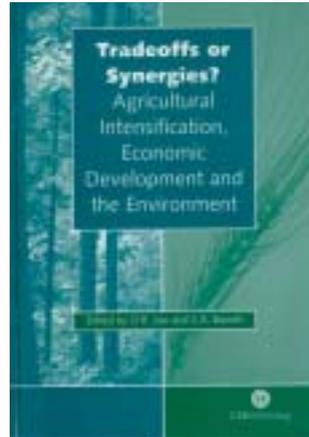
ISBN 3-925064-303
GTZ-ABS/LISTRA Protected Area Management and Transition Zone Development Project Postfach 5180 65726 ESCHBORN Germany Fax: (+49) 6196 79 6190 E-mail: michaela.hammer@gtz.de, rolf.mack@gtz.de, kirsten.hegener@gtz.de

IUCN Regional Office for Central Africa
BP 5506, YAOUNDÉ
Cameroon
Tel: (+237) 21 64 96
Fax: (+237) 21 64 97
E-mail: cogestion.iucn@camnet.cm

Kasperek Verlag
Mönchhofstr. 16
69120 HEIDELBERG
Germany
Fax: (+49) 6221 471 858
E-mail: Kasperek@t-online.de

This volume is designed to assist facilitators and partners of co-management processes. It provides guidelines for multi-stakeholder management of natural resources and describes in detail relevant concepts, methods and tools. The emphasis is on practical approaches and advice, in line with the experience gained in field initiatives promoted by GTZ and IUCN in Central Africa and elsewhere. The text is accompanied by definition boxes, example boxes, checklists, annexes illustrating participatory methods and tools of particular relevance for co-management processes, lessons learned, tips for action and a list of references and suggested readings.

LEE D.R., BARRETT C.B. (ED.), 2001. **TRADEOFFS OR SYNERGIES? AGRICULTURAL INTENSIFICATION, ECONOMIC DEVELOPMENT AND THE ENVIRONMENT.** CABI PUBLISHING, 538 P.



ISBN 0851-99-435-0
CABI Publishing
10 E 40th Street
Suite 3203
NEW YORK, NY 10016
USA
Tel: (+1) 212 481 7018
Fax: (+1) 212 686 7993
E-mail: cabi-nao@cabi.org

CAB International
Wallingford
OXON OX10 8DE
United Kingdom
Tel: +44 (0)1 491 832111
Fax: +44 (0)1 491 833508
E-mail: cabi@cabi.org
<http://www.cabi.org>

The need for increased food production, enhanced economic growth and poverty reduction, whilst at the same time achieving environmental sustainability, is a global issue of growing importance. This book addresses the linkages and tradeoffs involved in solving these challenges. Some of the approaches taken are conceptual and theoretical, others report on specific empirical cases in which linked economic, biophysical and policy models have been used to generate analytical estimates of tradeoffs, whilst others highlight institutional and policy issues involved in trying to achieve multiple social goals simultaneously. This book is essential reading for those working and studying in the areas of economic and agricultural development, environmental and forest management and policy, and international policy analysis.

BOURGUINAT E., RIBAUT J.P., 2000. **L'ARBRE ET LA FORÊT : DU SYMBOLISME CULTUREL À... L'AGONIE PROGRAMMÉE ?** EDITIONS CHARLES LÉOPOLD MAYER, 143 P.



ISBN 2-84377-048-3
Prix : 50 F (7,62 €)
Charles Léopold Mayer
38, rue Saint-Sabin
75011 PARIS
France
Tél. : 33 (0)1 48 06 48 86

Les traditions, les cultures et les religions qui se sont développées dans les zones forestières témoignent du respect des hommes pour la forêt. Dans les zones arides, les arbres qui parviennent à pousser et fournissent aux habitants nourriture, fourrage, pharmacopée et matériaux divers sont également chargés d'une symbolique très riche. Pourtant, depuis les origines, il existe aussi une compétition entre l'homme et la forêt, celle-ci faisant l'objet de défrichements en faveur de l'agriculture, de l'élevage ou, aujourd'hui, de diverses industries. Cette vieille compétition a désormais pris une ampleur dramatique, et la destruction de la forêt, en particulier des forêts tropicales, compromet à la fois les ressources des populations autochtones et la qualité environnementale de l'ensemble de la planète. Réunis en symposium à Klingenthal, des représentants de religions et de cultures du monde entier ont partagé la richesse symbolique revêtue par l'arbre et la forêt dans leurs traditions respectives, et débattu des différentes menaces qui pèsent sur la forêt et des moyens d'y répondre. Au-delà des solutions économiques ou politiques, l'homme ne doit-il pas replonger dans ses racines culturelles pour retrouver le secret d'un développement durable et harmonieux au sein de la nature ?



Publish by Abstract

Microsatellite Primer Amplification by Multiplexing: A First Application to *Eucalyptus grandis*

GILLES CHAIX^{1,*}, ISABELLE CHANTAL², MIREILLE POITEL³, SYLVIE RAZAFIARIVELO¹, DANIEL VERHAEGEN³ and JEAN CHARLES MAILLARD²

¹Cirad-forêt/Fofifa B.P. 745 Antananarivo 101, Madagascar; ²Cirad-emvt Campus International de Baillarguet TA 30G 34398 Montpellier Cedex 5, France; ³Cirad-forêt Campus International de Baillarguet TA 10C 34398 Montpellier Cedex 5, France

Abstract. Multiplexing was used to increase the efficiency of microsatellite analysis in *Eucalyptus grandis*. Primers were chosen based on the range of eucalyptus SSR alleles and their hybridization temperatures. Choice of PCR conditions proved to be the most important factor; concentrations of primers must be adjusted for use in combination. Results show that 6 primers can be analyzed in 2 PCR reactions, one containing 2 and the other containing 4 primers. Multiplexing promises to be a particularly efficient tool for microsatellite diversity analysis in *Eucalyptus grandis*.

Full text[†]: This manuscript, in detail, is available only in the electronic version of the *Plant Molecular Biology Reporter*.

Key words: *Eucalyptus grandis*, microsatellite, multiplexing, primer, sequencer

Introduction

The high productivity of *Eucalyptus* species is of strategic importance for tropical countries (Eldridge et al., 1993). In Madagascar, 150,000 of the 316,000 hectares that have been reforested have been planted with eucalyptus (DEF, 1996). The Fofifa and Cirad-forêt have conducted a breeding program, based on a seed orchard procedure, in order to generate selected seeds for the market (Chaix and Ramamonjisoa, 2001).

Eucalyptus species combine allogamy and self-pollination systems (Eldridge et al., 1993). The overall outcrossing rate of the genus was estimated to be as high as 74% (Moran and Bell, 1983). Inbreeding is a major drawback in tree development. Three-year-old plants, which were obtained after self-pollination, showed a 57% reduction in wood volume because of inbreeding (Van Wyk, 1981). Consequently, we need to efficiently discriminate at the nursery stage between

* Author for correspondence. e-mail: gilles.chaix@cirad.fr; fax: 261 20 22 209 99; ph: 261 32 07 842 29.

[†]Editor's note: Although the scientific content of this paper has been reviewed, the full text WEB document has not been edited in detail.

plants from self versus outcrosses. At present, the only possibility is the use of molecular markers.

Twenty microsatellite markers have been reported in eucalyptus (Brondani et al., 1998). These loci exhibit high levels of polymorphism, a large number of alleles, and a good genomic distribution. Therefore, they could be used for the identification and removal of self-crossed seeds produced in seed orchards.

We report here a study designed to increase the efficiency and reduce the cost and time required for PCR analysis. The number of PCR reactions is minimized by using different combinations of primer sets.

Materials and Methods

DNA extraction

The DNA extraction procedure was adapted from the methods of Shaghai Maroof et al. (1984) and Gawel and Jarret (1991).

Young leaves without red pigments were harvested during the wet season, dried for 48 h at 35°C, and stored at room temperature. Dry leaves (100 mg) were ground in liquid nitrogen and then mixed with 1.3 mL of extraction buffer (0.13 mM Tris-HCl [pH 8], 2% ATMB, 1.8 mM NaCl, 0.026 mM EDTA, 0.1% mercaptoethanol, 1% PVP). The resulting emulsion was incubated at 65°C for 1 h, and 400 μ L of dichloromethane was added to each tube. The tubes were shaken for 10 min and centrifuged at 3000 g for 10 min. The supernatant was poured off, and another dichloromethane extraction was performed.

After this second extraction, 7 μ L of 5 N NaCl and 500 μ L of cold isopropanol were added to each tube and mixed with the supernatant. The tube then was stored at -20°C for 1 h and centrifuged at 3000 g for 10 min. The supernatant was poured off, and 70% ethanol was added, mixed with the DNA pellet for 10 min, and centrifuged at 3000 g for 10 min. Ethanol was poured off, and the remaining ethanol was evaporated in a Speed-Vac at 40°C for 30 min. The resulting residue was dissolved in deionized water (100 μ L). The DNA concentration was measured in a TD 700 spectrofluorometer, and each DNA sample was diluted to 3 ng μ L⁻¹ with deionized water.

Amplification by multiplexing

Primers were chosen based on the size of SSR amplification product. Experimental conditions and hybridization temperatures are reported in Table 1. Seven loci were tested: Embra10, Embra13, and Embra19; Embra06 and Embra18; and Embra11 and Embra15 (Table 2).

The same fluorochrome was used to label the primers of different loci of nonoverlapping allele ranges (Table 1). The fluorochrome-labeled primers were from Applied Biosystems and Genset. The complementary sequences were from Life Technologies. Embra15 and Embra11 were labeled at 5' by Ned (yellow); Embra10, Embra13, and Embra19 by 6-Fam (blue); and Embra06 and Embra18 by Label Joe (green).

PCR amplifications of 18 ng genomic DNA were carried out in a final volume of 25 μ L, 0.312 μ M of each primer, 0.1 mM of each dNTP, 67 mM Tris-HCl

Table 1. Characteristics of 7 primers for *Eucalyptus grandis*.

SSR Locus	Allele Range	Hybridization Temperature ¹	Fluorochrome
Embra13	73-111 ¹	60°C	6-Fam (blue)
Embra10	115-149 ¹	60°C	6-Fam (blue)
Embra19 [*]	157-179 ¹	56°C	6-Fam (blue)
Embra15	90-125 ¹	54°C	Ned (yellow)
Embra11	124-158 ¹	56°C	Ned (yellow)
Embra18	70-110 ²	61°C	Label Joe (green)
Embra06	121-165 ¹	58°C	Label Joe (green)

¹This study

²Brondani et al., 1998

Table 2. Description of 7 microsatellites and sequences of primers for *Eucalyptus grandis* (Brondani et al., 1998).

SSR Locus	Nucleotide Repetition	Sequences of Primers
Embra06	(AG) ₁₉	5'-AgA gAA TTg CTC TTC ATg gA-3' 5'-gAA AAg TCT gCA AAg TCT gC-3'
Embra10	(CCT) ₃ (AG) ₁₄	5'- gTA AAG ACA TAg TgA AgA CAT TCC-3' 5'-AgA CAg TAC gTT CTC TAg CTC (A)-3'
Embra11	(AG) ₄ GG(AG) ₁₃	5'-gCT TAg AAT TTg CCT AAA CC-3' 5'-gTA AAA TCC ATg ggC AAg-3'
Embra13	(AG) ₂₇	5'-ATT TCC CTA ggT TTg ACA Tg-3' 5'-TCC AAC ATC TTA CTC AAC CA-3'
Embra15	(AG) ₂₁	5'-TTT gTT ggA TgA ggA CTT (g)-3' 5'-CAA CAT gTT CTC CgA AAA g-3'
Embra18	(AG) ₃ GG(AG) ₁₉	5'-CAG CTA ggA TgT TAg ACT Tgg-3' 5'-gCA CAC CTA gAA TTT TCA AAC TA-3'
Embra19	(AG) ₁₉	5'-gAC ggT TgA TTT CCT gAT T-3' 5'-gTg gTg CTC CTC TCC TCT-3'

In bold - Primer labeled by fluorochrome

(pH 8), 0.2 µg µL⁻¹ bovine serum albumin, 2 mM MgCl₂, 2 U *Taq* polymerase (Life Technologies ref. 180380026), and deionized water qs 25 µL. The PCR protocol consisted of a denaturing step (94°C for 4 min), followed by 29 amplifications of the following cycle (94°C for 1 min, 56°C or 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min), and finally one cycle of 72°C for 7 min.

Individual primer concentrations were adapted according to PCR amplification results and gel observations using 4% agarose and stained with ethidium bromide (Figure 1). The optimal combination of primer concentrations was validated on a sample of 10 genotypes.

Presequencing tests

To check the amplification quality of multiplexed PCR, amplified products were separated by 4% agarose gel electrophoresis in 1X TBE at 120 v for 3-3.5 h. Gels

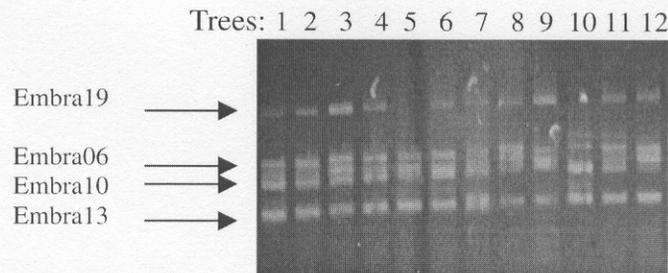


Figure 1: Result on agarose gel of mixture amplification Embra06, Embra10, Embra13, Embra19 for 20 trees. There are alleles of 4 loci: for example, tree 1 is homozygote for Embra19, Embra06 and heterozygote for Embra10, Embra13.

Table 3. Optimal primer concentration in multiplexing PCR for *Eucalyptus grandis*.

Primer Mix	Embra Primer Concentration (μM) for PCR						
	06	10	11	13	15	18	19
Alone	0.624	0.624	0.624	0.624	0.624	0.624	0.624
Embra06 + Embra11	0.468		0.934				
Embra06 + Embra18	0.416					0.930	
Embra11 + Embra15			0.312		0.934		
Embra06 + Embra11 + Embra15	0.306		0.612		0.918		
Embra10 + Embra13 + Embra19		0.408		0.510			0.918
Embra06 + Embra10 + Embra13 + Embra19	0.434	0.434		0.542			0.974

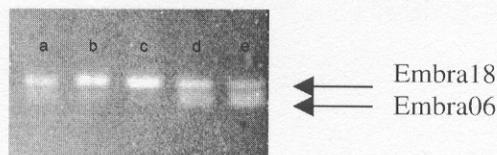


Figure 2: Example of adapting individual primer concentrations to PCR amplification between Embra06 and Embra18 (relative concentrations Embra06/Embra18 a: 1/1, b: 2/1, c: 4/1, d: 1/2, e: 1/4). When Embra06 primer concentration is enhanced in PCR, his signal decreased whereas that of Embra18 increased (b, c). When Embra06 primer concentration is decreased, inverse effect occurs (d, e). We could explain this result by direct interactions between the two pairs of primers or interactions on hybridization sites.

were stained with ethidium bromide. A mixture of 1.5 μL of 70% formamide, 13% mol wt markers, 17% EDTA, and 0.5 μL of PCR products was denatured (96°C for 1 min) and separated on denaturing polyacrylamide gels. Then, it was analyzed with the sequencer *Abi Prism*.

Results

In view of the possible hybridization temperatures, the 3 fluorochromes available, and the allelic ranges of variation, 6 combinations were effective when the

relative concentrations of the primers were adjusted specifically. The optimal primer concentrations are reported in Table 3. They varied from 0.306-0.974 μ M. Figure 1 shows an example of multiplexing amplification for 4 primers.

Several primers, such as Embra15, Embra18, and Embra19, required an increased concentration from 0.612-1.948 (data not shown) when mixed. Other primers, such as Embra06, Embra10, and Embra13, required a lower concentration. In the case of the combination of Embra06 with Embra18, the signal for Embra06 increased when its primer concentration decreased (Figure 2). We suggest this unusual result was caused by direct interactions between the 2 pairs of primers or interaction on hybridization sites.

In genotype identification, our method yields more rapid results (2 vs 7 d for migration on an acrylamide gel stained with silver nitrate). Two PCRs instead of 6 (Embra06+Embra10+Embra13+Embra19, Embra11+Embra15) are enough, and 1 migration on acrylamide gel rather than 6 is sufficient.

Discussion

Our results clearly demonstrate the feasibility of multiplexing *Eucalyptus grandis* microsatellite primers. Specific PCR amplification procedures were adapted. Optimal primer combinations and relative concentrations were defined, and the PCR products were positively tested using the ABI PRISM sequencing system. In conclusion, this new approach offers a particularly efficient tool for analysis of microsatellite diversity in eucalyptus.

Even though increasing numbers of microsatellite markers are available for eucalyptus, more are needed to widen the use of microsatellites in genetic mapping and analysis of diversity. This is the first study to show that multiplexing greatly reduces the analysis time while increasing the number of markers.

References

- Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, and Grattapaglia D (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl Genet* 97: 816-927.
- Chaix G and Ramamonjisoa L (2001) Production de semences pour les reboisements malgaches. *Bois et Forêts des Tropiques* 269: 49-63.
- DEF (1996) Inventaire écologique forestier national. Direction des Eaux et Forêts, Antananarivo.
- Eldridge KJ, Davidson J, and Hardwood Ch (1993) *Eucalyptus* domestication and breeding. Oxford, New York.
- Gawel N and Jarret RL (1991) Cytoplasmic genetic diversity in bananas and plantains. *Euphytica* 52: 19-23.
- Moran GF and Bell JC (1983) *Eucalyptus*. In: Tanksley SD, Orton TJ (eds), *Isozymes in plant genetics and breeding, part B*, pp 423-441, Elsevier, Amsterdam.
- Shanghai Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, and Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014-8018.
- Van Wyk G (1981) Inbreeding effects in *Eucalyptus grandis* in relation to degree of relatedness. *South African Forestry Journal* 116: 60-63.

Article accepté

Gene flow estimation with microsatellites in a
Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*

(Accepté par Theoretical Applied Genetics)

Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*

G. CHAIX,¹ S. GERBER,² V. RAZAFIMAHARO,¹ P. VIGNERON,³ D. VERHAEGEN³ AND S. HAMON⁴

¹*Cirad-Forêt/Fofifa, B.P. 745, Antananarivo 101, Madagascar*

²*INRA, Laboratoire de génétique et amélioration des arbres forestiers, BP 45, F-33611 Gazinet Cedex, France*

³*Cirad-Forêt, Campus de Baillarguet TA 10C, 34398 Montpellier Cedex 5 France*

⁴*IRD Montpellier, 911 Avenue Agropolis, 34032 Montpellier Cedex France*

Communicating author G. Chaix, e-mail: gilles.chaix@cirad.fr, Tel.: 261-3207-84229, Fax: 261-2022-20999

Abstract *Eucalyptus grandis* has a mixed mating reproductive system. Malagasy *Eucalyptus* seed orchards were established 15 years ago with two aims both based on panmixia: open-pollinated seed production and genetic improvement. The panmixia hypothesis has never been confirmed in the seed orchard. From a seedling seed orchard stand comprising 349 trees and using data obtained with 6 selected microsatellite markers, paternity analysis was performed for 724 offspring collected on 30 adult trees. Paternity assignment, based on exclusion procedures and likelihood ratio method, was achieved with high accuracy; the exclusion probability value was 0.997. The outcrossing rate was very high (96.7%). More than 50% of potential male trees (199 out of 349) in the seed orchard contributed to pollination for 440 offspring of thirty progenies (8.6% of the basic population). The pollination rate from outside the seed orchard was high (39.2%), but might be due to the small size of this seed orchard. This study showed that “panmixia-like pollination” can be assumed.

Keywords *Eucalyptus grandis*, pollen flow, seed orchard, paternity analysis, microsatellite, Madagascar

Introduction

In the last five years, Malagasy market demand for *Eucalyptus* seed has reached 150 to 250 kg annually. Seed orchards have been developed through research in order to supply smallholders with locally-improved varieties for a range of wood products (Chaix and Ramamonjisoa 2001).

Eucalyptus is subject to inbreeding depression. Effects have been recorded on seed yield, height, basal area and volume (Griffin and Cotteril 1988; Hardner and Potts 1995; Hardner and Tibbits 1998). In addition, for *E. grandis*, leaf and stem deformities and a consistently reduced vigour after self-pollination have been reported (Hodgson 1976; van Wyk 1981; Burgess and Williams 1996). Thus, in seed orchards, checking the origin of progenies is crucial.

Eucalypts are insect-pollinated species and have a mixed mating reproductive system. The *Eucalyptus* genus overall outcrossing rate is estimated to be up to 73% (Moran 1992). Typical of *Myrtaceae*, *E. grandis* nectar preferentially attracts *Apis mellifera* (Davis 1997). In some countries, *A. mellifera* has been introduced into *Eucalyptus* seed production areas to enhance seed production (Moncur et al. 1995). This insect is abundant in Madagascar but its efficiency in *Eucalyptus* pollination has not been verified. In this approach it is important to have efficient markers.

Highly polymorphic codominant markers such as microsatellites are increasingly used to study gene flows based on exclusion probabilities (Dow and Ashley 1996; Streiff et al. 1998; Byrne et al. 1996, Gerber et al. 2000). This kind of marker has been developed for *Eucalyptus* (Brondani et al. 1998) and could be used to test the breeding system in seed orchards. A multiplexing approach, of six discriminate microsatellites, was adapted to *E. grandis* (Chaix et al. 2002) and is available for studying seed orchard efficiency.

When establishing seed orchards, forest tree breeders attempt both to maximize breeding progress and preserve genetic diversity. Panmictic conditions are important because deviations from this theoretical model could lead to differences

between obtained and predicted genetic gains from the seed orchard and a significant genetic diversity reduction (Plomion et al. 2001).

The aim of this study was, in a Malagasy seed orchard, to estimate: the pollen cloud composition and the genitor relative contributions; and the outcrossing rate of *E. grandis*. Tests were done in a seed orchard, using microsatellites to determine i) the level of random mating; ii) the level of self-fertilisation; iii) the percentage of trees contributing to the next generation; iv) the equilibrium participation of putative genitors; and v) the pollen flow from outside the seed orchard.

Materials and methods

Study site

The *E. grandis* seedling seed orchard (SSO), established in 1987, is located next to Moramanga, Toamasina province, in the middle east Madagascar (latitude: 18°07S, longitude: 48°13W, about 900 metres asl). The mean annual air temperature is 19°C and annual rainfall is 1,500 mm.

Figure 1

The SSO encompasses 12 open pollinated progenies of five provenances. A single tree plot design, with 40 replicates of the 12 progenies (480 trees), was used. Initial spacing between trees was 3 x 3 m (1,111 trees per hectare) and the stand covers 0.6 ha (84 x 72 m). The SSO was surrounded by two borderlines (192 trees from a mixing of 12 families). One selective thinning, based on the growth characters, was performed in 1992. This thinning totally eliminated the family number five, and the effective family sizes ranged from 10 to 86 trees. The current tree density is 580 trees per hectare with a total of 242 trees in the central plot and 107 trees in borderlines (fig. 1). The mean height of SSO 11-year-old trees was 22 meters.

The data based on microsatellite markers, reported in this study, correspond to 349 mature trees of *E. grandis* and 724 progenies collected on 30 maternal trees highlighted in figure 1.

DNA extraction and microsatellite analysis

DNA extracts were prepared for the 349 trees of the seed orchard and 724 seedlings from seeds harvested in 1998 on 30 selected trees. The microsatellite loci were Embra06, Embra10, Embra11, Embra13, Embra15 and Embra19, and are located on different linkage groups.

Both simple PCR and multiplexed PCR were used. The multiplexed method was developed for this study and the protocol was described by Chaix et al. (2002). For simple PCR amplification, 9 ng of genomic DNA were used in a final volume of 12 μ l, 0.312 μ M of each primer, 0.1 mM of each dNTP, 67 mM Tris-HCl (pH 8), 0.2 μ g μ l⁻¹ bovine serum albumin, 2.0 mM MgCl₂, 2 U Taq polymerase (Life Technologies ref. 180380026) and deionised water q.s. 12 μ l. PCR involved a denaturing step of 94°C for 4 minutes followed by 29 amplifications of the following cycle (94°C - 1 minute, at 54, 56, 58, 60°C for 1 minute respectively for the loci Embra13, Embra10-Embra11, Embra15-Embra19 and Embra06, and 72°C - 1 minute) and finally one cycle of 72°C for 7 minutes.

PCR products were mixed with a buffer (95% formamide, 12.5% glycerol, 0.05% xylene cyanol, 0.05 bromophenol blue, 10 mM NaOH) and denatured at 96°C for 3 minutes before being resolved in 6% standard denaturing polyacrylamide gels, which were then silver-stained (Streiff et al. 1998). Electrophoretic patterns were analysed by double reading.

Paternity assignment

For each locus, allele frequencies were determined. Expected heterozygosity (H_e) was estimated according to Nei's method (1987). Statistical tests of Wright's fixation index (F) were performed by GENEPOP (Raymond and Rousset 1995). Microsatellite data were used in the paternity analysis, using FaMoz software

(S. Gerber, unpublished), which assigns paternity to a particular pollen donor, based on the likelihood ratio method. The paternity assignment methods by exclusion procedures were detailed in Streiff et al. (1999) and Gerber et al. (2000). The multilocus genotype of the mothers and 349 potential fathers was known for each offspring. The haplotype of the putative male parent of each offspring was inferred by subtracting the female contribution from its multilocus genotype. The maternal data were included to estimate selfing. The male haplotype was then compared to all possible haplotypes corresponding to the 349 trees of the seed orchard.

When allele frequencies in the population and genotypes from a set of offspring and a set of potential parents were available, the most probable single father was identified by the calculation of LOD scores. A ratio compares the likelihood of an individual being the parent of a given offspring divided by the likelihood of any other individual from the population being the parent (Meagher and Thompson 1986).

The population considered here was not isolated from other pollen sources, and the adult trees genotyped were only a subset of all the potential parents of the reproducing population. The total gene flow can therefore be subdivided into two different components: (GFO) gene flow from outside the stand and (GFI) gene flow from inside the stand (Gerber et al. 2000). Estimated GFO, using parentage analysis, is probably underestimated because foreign gametes and local gametes may be indistinguishable. Cryptic gene flow corresponds to GFO events that have been falsely attributed to GFI events (Devlin and Ellstrand 1990).

Using the genotypes of the 349 trees at the six microsatellite loci, we generated 10,000 random offspring. In set 1, each offspring had a father among the 349 trees, randomly chosen, with selfing possible (GFI). In set 2, each offspring was constructed by randomly picking a mother and a gamete in the mother and by selecting the second allele at each locus at random, according to their frequency. Fathers of these offspring were assumed not to be among the 349 genotyped trees (GFO). Genotyping error (0.1%) could be included in the simulation. The potential fathers giving the highest LOD scores were recorded and the

distributions of these LOD scores were plotted. We compared the distributions of LOD scores of the most likely father of the offspring from set 1 with those of the offspring from set 2. In order to minimise type I and type II errors, thresholds of LOD scores were chosen at the intersection of the two distributions. The test was applied to simulated data, to check the proportion of correct decisions made (Gerber et al. 2000).

Pollination pattern

Pollination efficiency depends on insect activity and individual floral contribution, tree distances, and the dominant wind direction. Male mating success, as a function of distance, was analysed by subdividing the neighbourhood of a maternal tree into increasing nine metres distance classes. This distance was chosen in accordance with the size of the seed orchard and because spacing between trees was three metres. The offspring fertilised by such or such father are entered in the class corresponding to the distance between the two parents. The offspring fertilised by paternal trees were included in each distance according to the maternal tree. The number of pollinating male parents was compared with the potential number of trees. Comparisons were made using a one-tailed Mann-Whitney-Wilcoxon test of the null hypothesis that no distance restriction applies to pollination.

Results

Six microsatellites were used to screen the diversity of 973 *E. grandis* genotypes. They correspond to the seed orchard 349 trees, the parental population, and 724 seedlings harvested on thirty parental trees.

Genetic diversity of the parental populations

Table 1

Diversity parameters for six microsatellite loci, exclusion probability (EP) and identity probability (IP) for parental populations are reported in table 1. Microsatellite markers were highly polymorphic for the parental population with a total of 101 different alleles. The number of alleles per locus (A_o) ranged from 10 (Embra19) to 21 (Embra06) with a mean of 16.8. The effective number of alleles (A_e) reflects the difference in polymorphism between microsatellite loci. Values of parental A_e varied from 2.9 to 8.3 with an average of 5.2. The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.47 (Embra15 and Embra19) to 0.84 (Embra06 and Embra10). Deviations from Hardy-Weinberg expectations measured as the heterozygote deficiency (F) showed a statistically highly significant heterozygosity deficit (0.1352). High exclusion probability (EP = 0.9970) and low identity probability (IP = 0.000132) confirm that 6 microsatellite markers are enough, under our conditions, for paternity assignment. A LOD score threshold of 4.7 was considered sufficient to choose a potential parent as the true father.

Genetic diversity of the offspring populations

Table 2

Diversity parameters for six microsatellite loci and exclusion probability (EP) and identity probability (IP) for offspring populations are reported in table 2. The allele number per locus ranged from 14 (Embra15 and Embra19) to 20 (Embra06) with a mean of 16.5. Values of offspring A_e varied from 2.9 to 7.4 with an average of 4.1. As for the parental populations, the F value for the progeny population showed a statistically highly significant heterozygosity deficit (0.0855) and the locus Embra15 has the maximum and statistically highest significant values.

Paternal assignment

Table 3

Results of paternity assignment for 30 progenies are recorded in table 3. The 724 plants correspond to seeds harvested on 30 maternal trees for which sample sizes varied from 11 to 60 plants. Depending on the mother, the frequency of allopollination varied from 72.7 to 100 and averaged 96.7%. The outside pollen rate was deduced from the percentage of progenies whose paternity was not determined inside the seed orchard. On average, gene flow by pollen inside the orchard was 60.8%, ranging from 30.4 to 73.7% depending on the mother. It was 39.2% outside the orchard - ranging from 26.3 to 69.6%.

Figure 2

If we consider the 440 seedlings fathered by male parents from the seed orchard, 199 trees (56%) participated as pollen donor. Among identified pollen donors, 103 (51.7%) fathered two or more progenies. The maximum was 12. For a given male parent, the mean contribution reached 2.1 offspring. Each of them had 1 to 7 partners on 30 maternal trees and half of paternal trees (49.7%) were involved in only one mating event (fig. 2).

Table 4

In table 4, we reported the family and provenance ratio for parental and identified populations. Five provenances (11 families) composed the seed orchard. Unequal contributions were observed for pollen donors for families 3 (Andranokobaka), 9 and 10 (Ravenshoe). Families 9 and 10, with a ratio near 0.5, were under-represented in the observed pollen cloud; conversely, the family 3, with a ratio of 2.02, was over-represented. In the observed pollen cloud, the borderline trees contributed 30% of the potential male population.

Pollination patterns

Figure 3

The geographic distributions of pollen donors are presented for 8 maternal trees (fig. 3). Within the seed orchard, the pollination pattern did not seem to have a particular direction. The distribution behaviour of pollen donors for each maternal tree seemed to be independent of their position in the seed orchard. Nevertheless, distances between the maternal tree and the pollen donor were similar to the size of the seed orchard.

Figure 4

The distributions of potential vs identified male parents, as a function of distance from the maternal tree, are illustrated in fig. 4. Even if there were statistically significant deviations between expected and observed distributions for two mothers (17 and 24), all the maternal data showed that there was not a statistically significant excess of neighbouring pollinating parents in comparison with the potential pollen donors. Based on the relative position of paternal trees and maternal trees within the seed orchard, the mean distance of pollination was 32 metres with a maximum value of 85 metres. The pollination mean distances for each maternal trees depended on their place in the seed orchard because the relative mean distance for a tree near the borderline was greater than for a tree in the central zone of the seed orchard.

Discussion

Microsatellite markers were used for paternity analysis of 349 *Eucalyptus* parental trees located in a Malagasy seed orchard. Microsatellite markers appeared to be powerful tools for tracing pollen flow in this context. Results showed that the overall outcrossing rate was high (96.7%) with little differential contributions according to family and provenances. In the seed orchard, half the paternal trees participated in pollination for thirty progenies (440 individuals) and no particular

pollination direction was observed. Nevertheless, the pollen flow from outside the stand reached nearly 40%.

Reproductive behaviour inside the seed orchard

The use of 6 *Eucalyptus* microsatellites gave high exclusion and high identity probabilities. These observations confirmed that a few microsatellite markers were enough for paternity assignment. As shown for some other species, the large number of low-frequency alleles and their distributions, typical of microsatellite loci, positively influence the exclusion probabilities (Dow and Ashley 1998; Streiff et al. 1999; Kameyama et al. 2000; Konuma et al. 2000).

The overall outcrossing rate was high (96.7%) with no neighbouring effect. On the female side, it could be argued that a sample of 30 progenies, 10% of the 349 potential trees, is unrepresentative of the totality. But, on the male side, more than 50% of potential male parents contributed to the 362 identified matings. If we examine the results at the level of families or origins, the parental population contribution was slightly unequal. Paternal trees from families 9 and 10, Ravenshoe provenance, were under-represented in the pollen cloud. Unpublished data seems to indicate phenological problems, those families flowered later than other provenances.

Few studies concern data on outcrossing rate in *Eucalyptus* seed orchards. In addition, plantations and establishment conditions (density, height, genotype and random unrelated neighbouring) could modify outcrossing rate (Moran et al. 1989).

In seed orchards, Sato and Mori (1996) reported slightly lower values for *E. grandis* ($t_m = 87.2\%$) but Moran et al. (1989) obtained higher values for *E. regnans* ($t_m = 91\%$). Concerning *E. globulus*, the outcrossing rate varied according to stand density. The value was near 100% in closed forest but at a lower density (1 tree per hectare) individual values decreased from 81% to 48% (Hardner et al. 1998).

In natural populations, the outcrossing rate seemed lower than in seed orchards. Few studies have reported this rate for *E. grandis* in exotic conditions but data were reported for other species. Moran et al (1989) found 74% in an *E. regnans* natural population. For *E. citriodora*, Yeh et al. (1983) reported an outcrossing rate of 85% estimated with isozymes. For *E. urophylla*, Gaiotto et al. (1997) estimated around 90% with RAPD and AFLP markers.

The within-tree harvest location or the relative size of the trees could modify the estimation. Moran and Brown (1980) showed that, usually, the viability of seeds resulting from self-pollination was lower and the estimated outcrossing rate increases with seed maturity. Consequently, it is possible that the true degree of outcrossing in the seed orchard may be lower because a part of the inbred seeds did not germinate or have a lower viability. This could be important from a basic point of view but could be easily managed with microsatellites. Seeds are harvested preferentially from the bottom of the canopy. It will be interesting to control the outcrossing rate variability due to the different capsule positions in the crown. Different levels constitute the canopy and pollen flow may differ from one level to another. In natural forest, Patterson et al. (2001) reported a lower outcrossing rate for suppressed trees than for dominant trees. Crosses could preferentially occur into the bottom or top of the canopy. It would be interesting to verify whether the most accessible seed is the most inbred and if seeds result from crosses into this part of the canopy.

Reproductive behaviour outside the seed orchard

The pollen flow from outside the stand reached nearly 40%. Clearly, the seed orchard was not spatially isolated from other populations and a high proportion of alien pollen flow was found. The percentage of individual contamination by alien pollen varied from 26.3 to 69.6%.

The small orchard area is one of the main reasons for these observations. Contamination rate is probably linked to seed orchard area because the seed orchard length was smaller than the potential distance of pollination. The nearest pollen sources were the *E. robusta* test (interfertile with *E. grandis*) and the

E. grandis seed orchard located 100 and 400 metres away, respectively. Other sources, essentially of *E. robusta*, were situated at one kilometre. Grosser et al. (2001) reported a contamination rate of 5% in an *E. nitens* Australian seed orchard, but the experimental conditions were not described. The presence of bees in the area also suggested that pollen could be carried several kilometres and be exchanged in the hive (B. Vaissiere, personal communication). Microsatellite markers helped to demonstrate that long-distance pollen flow within populations is relatively common for wind-pollinated species (Dow and Ashley 1996; Streiff et al. 1999) and insect-pollinated species (Chase et al. 1996; Horskins and Turner 1999; Konuma et al. 2000).

These results are not exceptional and such a phenomenon is frequent. The contamination rate for a pine seed orchard ranged from 14 to 74% (Pakkanen et al. 2000). A common trend, among oak studies, is a high percentage (50-70%) of offspring with male parents outside the study sites (Dow and Ashley 1998; Streiff et al. 1999). Konuma et al. (2000) studied a low-density stand of insect-pollinated (by stingless bees or *Apis* spp.) *Neobalanocarpus heimii*. They found an alien pollen rate of 29%, ranging from 21 to 69%. The estimated average mating distance exceeded 500 metres. Using a similar approach, Kameyama et al. (2000) estimated 20 to 30% alien pollen for *Rhododendron metternichii*.

In conclusion, even if we estimated that the high contamination rate was related to the small size of this seed orchard, and we suspected preferential mating within early or late flowering trees and within dominant or suppressed trees, “panmixia-like pollination” can be assumed. In addition, the study showed that it is possible to identify the paternal origin of young plantlets before planting. This enables the breeder rapidly to create a "true" panmictic population with an equilibrium between the different genotypes and populations by excluding plants from self-fertilisation, related individual crosses, or with a paternal origin outside the seed orchard.

Acknowledgements

This paper represents a portion of the doctoral research of G. Chaix supported by the Scientific Directorate of Cirad (ATP Vergers à graines) and by Cirad-forêt. We wish to thank F. Rasolo, Y. Rabenantoandro, H. Randrianjafy (Fofifa), G. Rabetsoa (Fanalamanga) and A. Charrier (Ensam) for agreeing to conduct this work in Madagascar, J.C. Maillard, I. Chantal, M. Poitel, S. Razafiarivelo for their help in the laboratory and J. Rakotonjanahary, N. Ratovoson, and J. Rakotondrasoa for their field work.

References

- Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, Grattapaglia D (1998) Development characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*. *Theor Appl Genet* 97:816-827
- Burgess IP, Williams ER (1996) The effect of outcrossing rate on the growth of selected families of *Eucalyptus grandis*. *Silvae Genet* 45:2-3
- Byrne M, Marquez Garcia MI, Uren T, Smith DS, Moran GF (1996) Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Aust J Bot* 44:331-341
- Chaix G, Ramamonjisoa L (2001) Production de semences pour les reboisements malgaches. *Bois et Forêts des Tropiques* 269:49-63
- Chaix G, Chantal I, Poitel M, Razafiarivelo S, Verhaegen S, Maillard JC (2002) Microsatellite primer amplification by multiplexing: a first application to *Eucalyptus grandis*. *Plant Mol Biol Rep* 20:67a-67e
- Chase MR, Moller C, Kessel R, Bawa K (1996) Distant gene flow in tropical tree. *Nature* 383:398-399
- Davis AR (1997) Influence of floral visitation on nectar-sugar composition and nectary surface changes in *Eucalyptus*. *Apidologie* 28:27-42
- Devlin B, Ellstrand NC (1990) The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. *Evolution* 44:248-259
- Dow BD, Ashley MV (1996) Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Mol Ecol* 5:615-627
- Dow BD, Ashley MV (1998) High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Heredity* 89:62-70
- Gaiotto FA, Bramucci M, Grattapaglia D (1997) Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 95:5-6
- Gerber S, Mariette D, Streiff R, Bodénès C, Kremer A (2000) Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Mol Ecol* 9:1037-1048
- Griffin AR, Cotteril PP (1988) Genetic variation in growth of outcrossed, selfed and open-pollinated progenies of *Eucalyptus regnans* and some implications for breeding strategy. *Silvae Genet* 37:124-131
- Grosser C, Vaillancourt R, Potts B, O'Sullivan H (2001) Paternity analysis in a *Eucalyptus nitens* clonal seed orchard. In: Proceedings developing the eucalypt of the future, IUFRO International Symposium 10-15 Sept. 2001, Valdivia, Chile pp.133
- Hardner CM, Potts BM (1995) Inbreeding depression and changes in variation after selfing in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*. *Silvae Genet* 44:46-54
- Hardner C, Tibbits W (1998) Inbreeding depression for growth, wood and fecundity traits in *Eucalyptus nitens*. *Forest Genet* 5:11-20

- Hardner CM, Potts BM, Gore PL (1998) The relationship between cross success and spatial proximity of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* parents. *Evolution* 52:614-618
- Hodgson LM (1976) Some aspects of flowering and reproductive behavior in *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden at JDM Keet Forest Research Station: 2. The fruit, seed, seedlings, self fertility, selfing and inbreeding effects. *South Afric For J* 97:32-43
- Horskins K, Turner VB (1999) Resource use and foraging patterns of honeybees, *Apis mellifera*, and native insects on lowers of *Eucalyptus costata*. *Aust J Ecol* 24:221-227
- Kameyama Y, Isagi Y, Naito K, Nakagoshi N (2000) Microsatellite analysis of pollen flow in *Rhododendron metternichii* var. *hondunese*. *Ecol Res* 15:263-269
- Konuma A, Tsumura Y, Lee CT, Lee SL, Okuda T (2000) Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (*Dipterocarpaceae*), inferred from paternity analysis. *Mol Ecol* 9:1843-1852
- Meagher TR, Thompson E (1986) The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. *Theor Pop Biol* 29:87-106
- Moncur MW, Mitchell A, Fripp Y, Kleinschmidt GJ (1995) The role of honeybees (*Apis mellifera*) in eucalypt and acacia seed production areas. *Com For Rev* 64:350-354
- Moran GF, Brown AHD (1980) Temporal heterogeneity of outcrossing rates in alpine ash (*Eucalyptus delegatensis* R.T. Bak.). *Theor Appl Genet* 57:101-105
- Moran GF, Bell JC, Griffin AR (1989) Reduction in levels of inbreeding in a seed orchard of *Eucalyptus regnans* F. Muell. compared with natural populations. *Silvae Genet* 38:32-36
- Moran GF (1992) Patterns of genetic diversity in Australian tree species. *New For* 6:49-66
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Pakkanen A, Nikkanen T, Pulkkinen P (2000) Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scand J For Res* 15:399-404
- Patterson B, Potts B, Vaillancourt R (2001) Variation in outcrossing rates within the canopy of *Eucalyptus globulus*. In: *Proceedings developing the eucalypt of the future, IUFRO International Symposium 10-15 Sep. 2001, Valdivia, Chile*, pp. 132
- Plomion C, LeProvost G, Pot D, Vendramin G, Gerber S, Decroocp S, Brach J, Raffin A, Pastuszka P (2001) Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. *Can J For Res* 31:1816-1825
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 83:239
- Sato AS, Mori ES (1996) Detection of inbreeding in seeds of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. *Rev Inst Flor* 8:131-134
- Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkeller H, Glössl, Kremer A (1998) Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Mol Ecol* 7:317-328
- Streiff R, Ducouso A, Lexer C, Steinkellner H, Gloessl J, Kremer A (1999) Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* and *Q. petraea*. *Mol Ecol* 8:831-841
- Van Wyk G (1981) Inbreeding effects in *Eucalyptus grandis* in relation to degree of relatedness. *South Afri For Jour* 116:60-63
- Yeh F, Brune A, Cheliak WM, Chipman DC (1983) Mating system of *Eucalyptus citriodora* in a seed-production area. *Can J For Res* 13:1051-1055

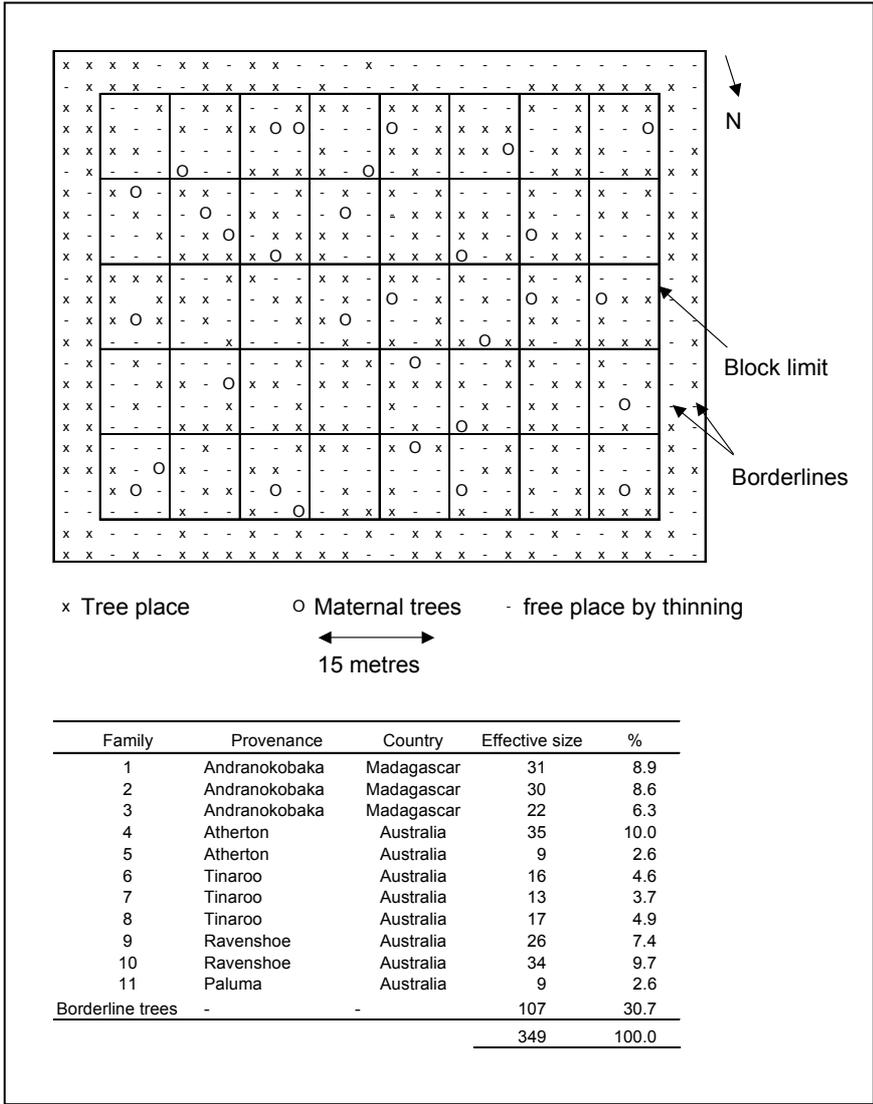
Figure legends

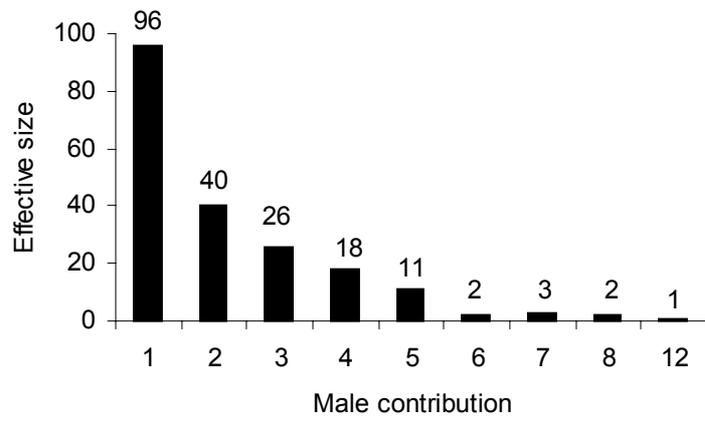
Fig. 1 Map of the *Eucalyptus grandis* seedling seed orchard. Spatial distribution and family description.

Fig. 2 Distribution of male contributions (total number of fathers = 199). Each bar corresponds to the number of times a pollen donor pollinated a mother tree.

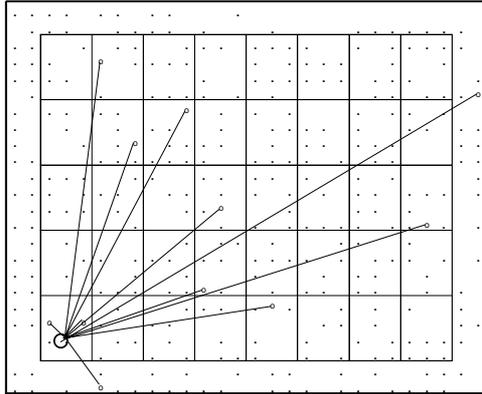
Fig. 3 Distribution of pollen parents within the seed orchard (84 by 72 metres) for eight maternal tree progenies (1, 10, 13, 15, 17, 23, 24, 28). Open circles (o) indicate pollen parents. Lines indicate pollen flow to the maternal tree. Line thickness is proportional to the number of successful pollen grains of the paternal tree. Arrows with %: percentage of offspring from a parent identified outside the seed orchard.

Fig. 4 Potential (white bars) and pollinating (black bar) male parent distributions as a function of the distance to the four maternal trees (A: 10, B: 13, C: 17, D: 24) and all thirty maternal trees (E). One-tailed Mann-Whitney-Wilcoxon tests were applied to the shift to the left observed in the potential distribution (restriction caused by the distance), in the distance classes. Mother trees 17 and 24 both show a statistically significant deviation between potential and effective distributions at the 5% level.

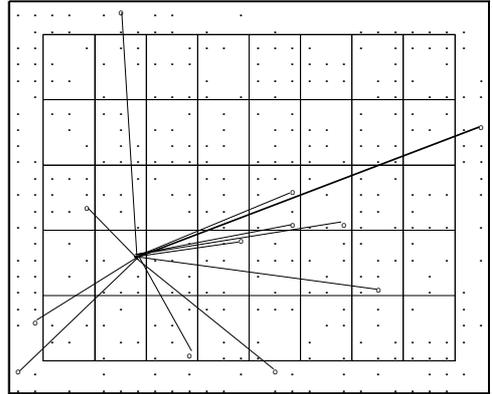




Maternal tree 1



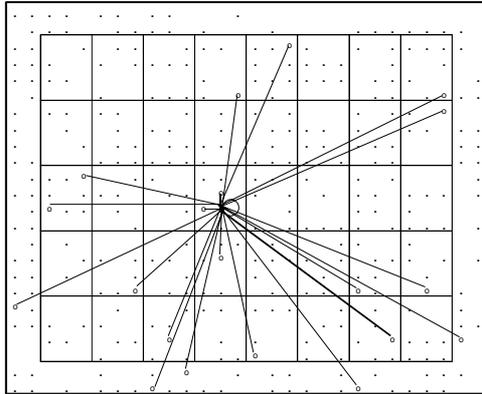
Maternal tree 10



← 35%

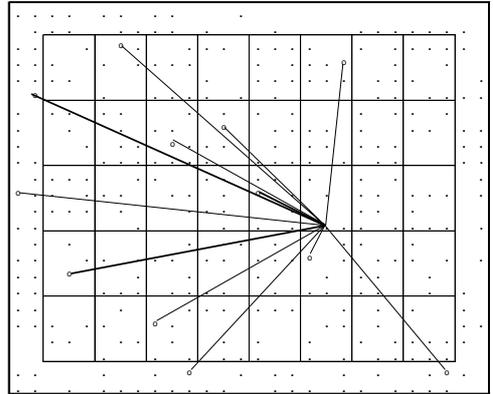
← 26%

Maternal tree 13



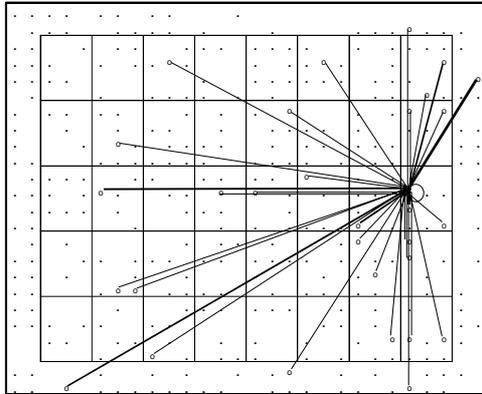
← 52%

Maternal tree 15



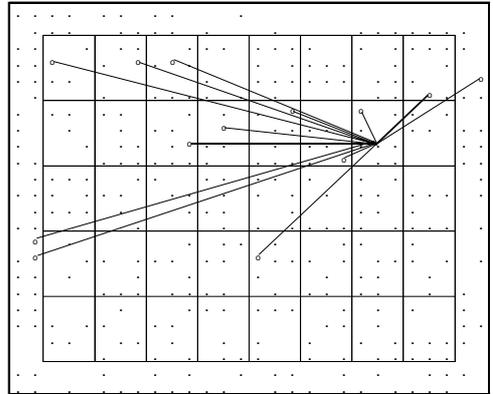
← 27%

Maternal tree 17



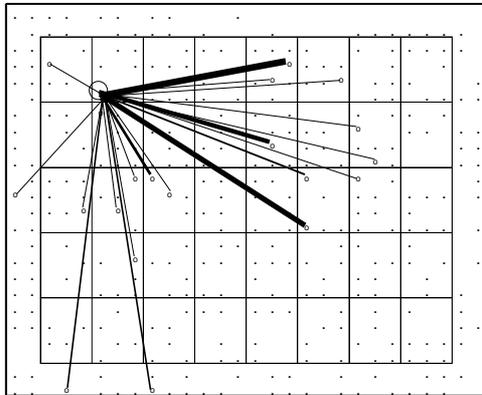
← 35%

Maternal tree 23



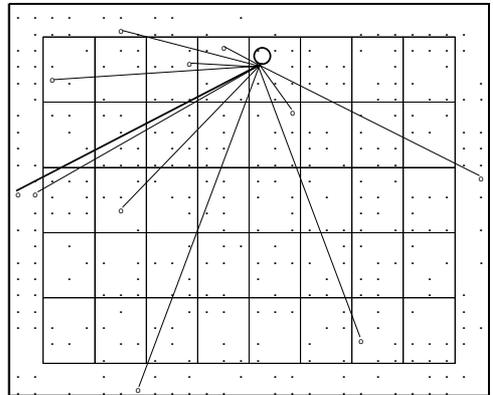
← 32%

Maternal tree 24



← 32%

Maternal tree 28



← 26%

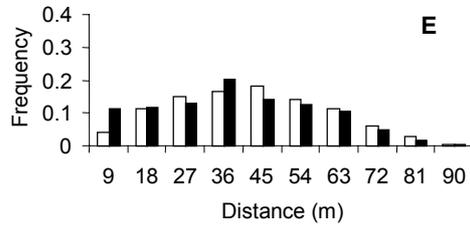
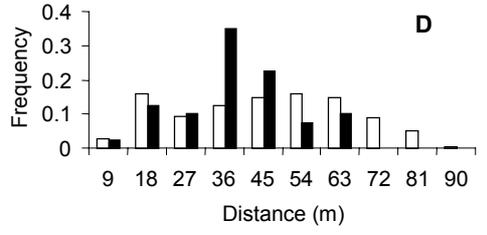
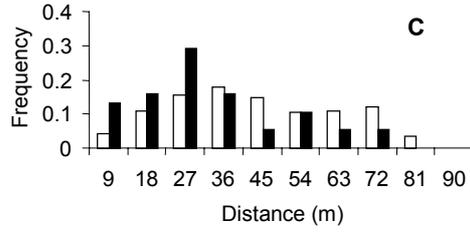
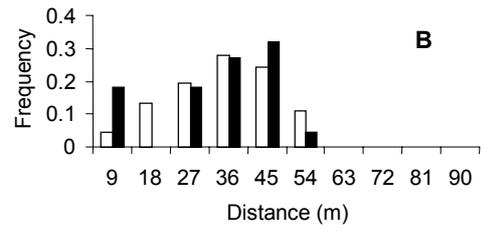
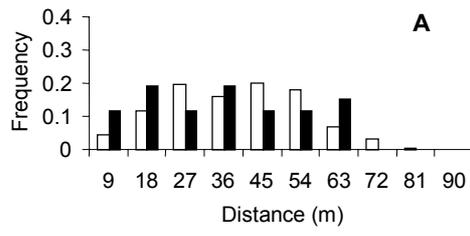


Table 1 Diversity parameters for six microsatellite loci, exclusion probability (EP) and identity probability (IP) for parental populations. (A_o , A_e : observed and efficient number of alleles, H_o , H_e : observed and expected heterozygosity, $F = 1-(H_o/ H_e)$).

Locus	A_o	A_e	H_o	H_e	F	EP	IP
Embra06	21	6.4	0.8420	0.8446	0.0031 ^{ns}	0.698	0.039586
Embra10	14	7.7	0.8391	0.8705	0.0361 ^{ns}	0.738	0.029648
Embra11	17	3.4	0.6185	0.7062	0.1242 [*]	0.519	0.106655
Embra13	19	2.6	0.7049	0.6163	-0.1494 ^{ns}	0.424	0.167533
Embra15	20	8.3	0.4737	0.8813	0.4624 ^{**}	0.761	0.024531
Embra19	10	2.9	0.4770	0.6578	0.2749 ^{**}	0.435	0.152592
All locus	16.8	5.2	0.6592	0.7623	0.1352 ^{**}	0.997	0.000132

Level of significance: ^{ns}=p>0.05, ^{*}= p<0.05, ^{**}=p<0.01

Table 2 Diversity parameters for six microsatellite loci, exclusion probability (EP) and identity probability (IP) for offspring populations. Diversity parameters for six microsatellite loci in offspring population (A_o , A_e : observed and efficient number of alleles, H_o , H_e : observed and expected heterozygosity, $F = 1-(H_o/ H_e)$).

Locus	A_o	A_e	H_o	H_e	F
Embra06	20	5.2	0.7375	0.8076	0.0891 ^{**}
Embra10	17	7.4	0.8584	0.8660	0.0081 ^{ns}
Embra11	17	3.3	0.6481	0.6965	0.0695 ^{ns}
Embra13	17	2.7	0.7431	0.6260	-0.1871 ^{ns}
Embra15	15	5.0	0.5129	0.8009	0.3596 ^{**}
Embra19	14	2.9	0.5793	0.6620	0.1249 ^{**}
All locus	16.5	4.1	0.6799	0.7435	0.0855 ^{**}

Level of significance: ^{ns}= $p>0.05$, * = $p<0.05$, **= $p<0.01$

Table 3 Result of paternity assignment for 30 progenies (N: number of analysed seedlings, N₁: number of seedlings matching a male parent in the seed orchard, N₂: number of seedlings resulting from selfing, t_m: outcrossing rate, N₃: observed male number).

Maternal tree	Family	N	N ₁	N ₁ /N (%)	N ₂	t _m (%)	N ₃
1	1	20	13	65.0	2	90.0	12
2	10	23	7	30.4	1	95.7	7
3	1	20	13	65.0	0	100.0	10
4	3	11	6	54.5	0	100.0	6
5	8	18	13	72.2	0	100.0	13
6	1	19	12	63.2	0	100.0	11
7	2	20	13	65.0	0	100.0	12
8	9	19	14	73.7	1	94.7	13
9	4	20	11	55.0	0	100.0	10
10	8	50	26	52.0	0	100.0	24
11	2	20	9	45.0	0	100.0	8
12	4	20	9	45.0	0	100.0	7
13	2	48	23	47.9	1	97.9	21
14	4	22	16	72.7	2	90.9	8
15	8	18	15	83.3	0	100.0	12
16	1	18	8	44.4	0	100.0	8
17	7	60	39	65.0	1	98.3	31
18	9	19	9	47.4	0	100.0	8
19	4	20	13	65.0	0	100.0	10
20	8	19	14	73.7	0	100.0	14
21	3	20	14	70.0	0	100.0	13
22	3	19	10	52.6	0	100.0	10
23	4	22	15	68.2	0	100.0	13
24	1	60	41	68.3	1	98.3	21
25	1	19	12	63.2	0	100.0	12
26	2	20	13	65.0	1	95.0	10
27	3	19	14	73.7	5	73.7	8
28	2	19	14	73.7	2	89.5	12
29	4	20	12	60.0	1	95.0	12
30	3	22	12	54.5	6	72.7	7
Total		724	440	-	24	-	199
Average		-	-	60.8	-	96.7	

Table 4 Family and provenance ratio for parental and male identified populations. Ratio was calculated as the frequency of the family (or provenance) for the identified male population divided by the frequency of the family (or provenance) for the parental population.

Provenance	Provenance level	Family identification	Family level
Andranokobaka	1.41	1	1.16
		2	1.23
		3	2.02
Atherton	0.95	4	1.03
		5	0.65
Tinaroo	1.18	6	1.78
		7	0.65
		8	1.02
Ravenshoe	0.47	9	0.53
		10	0.42
Paluma	1.11	11	1.11
Borderline trees	0.90	-	0.90

Article soumis

Evidence of differential reproductive contributions among five genetic origins in a Malagasy *Eucalyptus grandis* seed orchard: consequences for seed production.

(Soumis à Theoretical Applied Genetics)

Evidence of differential reproductive contributions among five genetic origins in a Malagasy *Eucalyptus grandis* seed orchard: consequences for seed production.

G. CHAIX,¹ P. VIGNERON,² V. RAZAFIMAHARO,¹ AND S. HAMON³

¹*Cirad-forêt/Fofifa, B.P. 745, Antananarivo 101, Madagascar*

²*Cirad-forêt, Campus de Baillarguet TA 10C, 34398 Montpellier Cedex 5 France*

³*IRD Montpellier, 911 Avenue Agropolis, 34032 Montpellier Cedex France*

Communicating author G. Chaix, e-mail: gilles.chaix@cirad.fr, Tel.: 261-3207-84229, Fax: 261-2022-20999

Abstract Seed orchards are the most common and cost-effective means of providing a stable supply of genetically improved seed. Phenological observations are a valuable source of information for investigating the potential genotype contribution of seed orchards. The aim of this work was to analyze, in a *Eucalyptus grandis* seed orchard, the potential phenological impact of the different provenances' reproductive behavior on the final seed sample composition. As for vegetative growth, the results showed a good flowering adaptation expressed by a high flowering level with constant cycle over three years. Nevertheless, behavioral differences were observed for the various origins, suggesting putative pollination disequilibrium. These results can be used to monitor seed orchard harvests so as to improve the quality of delivered varieties and the management of breeding populations.

Keywords *Eucalyptus grandis*, seed orchard, phenology, pollen cloud, Madagascar

Introduction

In Madagascar, fast-growing eucalypts were established, via the introduction of *Eucalyptus grandis* genetic resources and the use of seed orchards, to supply smallholders with locally improved varieties adapted to local market requirements (Lebot and Ranaivoson 1994, Chaix and Ramamonjisoa 2001). To ensure a long-term genetic gain, the seed orchard procedure requires that breeding populations have a large genetic diversity and a low consanguinity level. This mean gene exchange is effective between origins introduced from different natural area and local races.

Eucalyptus species are known to have a good and a constant flowering cycle but, depending on the year, abundance or paucity may occur (Dale and Hawkins 1983, Setterfield and Williams 1996, Law et al. 2000). *E. grandis* is monoecious with a slight protandry. The stigma becomes receptive three to four days after anthesis. This mechanism, which largely prevents self-pollination at the single flower level, is less effective at the tree level because flowers are asynchronous along branches. The *Eucalyptus* do not express specificity regarding the pollinating insects (Pryor 1976, Hingston and Potts 1998). Nevertheless, in some countries, to enhance seed production, honeybees were introduced in *Eucalyptus* fields. By lowering flower abortion they increased the outcrossing rate and helped to obtain a greater seed ratio per capsule (Moncur et al. 1993, Hardi and Kanso 1995, Moncur et al. 1995).

In the design of a seed orchard, the major problem is mastery of the reproductive sequences. Deviation from the panmixia model, through incomplete flowering synchrony or any other problem, could reduce the efficiency of seed orchards and lead to: i) an unbalanced contribution of genitors to the next generation; ii) low effective population size; iii) preferential mating within early or late flowering populations; iv) self-fertilisation and or pollination by alien pollen. Deviation from the panmictic situation will produce both an unexpected low genetic gain and a reduced genetic diversity (Kang and Lindgren 1998, Plomion et al. 2001).

Behind this simple formulation, there are a lot of biological constraints that must be evaluated and managed. They include those related to the spatial architecture

inside the seed orchard - relative growing, crown development, light competition - the diversity in flowering traits - relative phenology, pollen vector activities, pollen flow, intra- and inter-self-sterility - and the impact of ecological conditions and climatic variations (Moncur and Boland 2000).

The aim of this work was to analyze the potential impact of the different provenances' reproductive behavior on the final seed sample composition. Reported observations focused on the relative parental contribution in the seed orchard and the analysis of differences between provenance contributions.

Materials and methods

Study site and seedling seed orchard composition

The *E. grandis* SSO (seedling seed orchard), established in 1987, is located in eastern central Madagascar (latitude: 18°07S, longitude: 48°13W, about 900 asl). The mean annual air temperature is 19°C and summer rainfall around 1,500 mm (January to April) with fine drizzle during winter (from July to September). The adjacent vegetation is savanna, a *Pinus* plantation and some *Eucalyptus* or *Acacia* plantations nearby. At the time of the study, the mean height of ten-year-old trees was around 22 meters, with a mean diameter at breast height of 25-30 cm.

Figure 1

Table 1

The SSO encompasses 12 open pollinated progenies of four Australian provenances and one Malagasy. A single tree plot design with 40 replicates of the 12 progenies was used (fig. 1). The altitude of the Australian provenances and the Malagasy provenance is between 800 and 940 meters and similar to that of the Paluma study site situated furthest south of the natural area (table 1). The Andranokobaka provenance is located 2 kilometers from the study site and the origins of mother trees were, respectively, Atherton and Ampamaherana

(Madagascar) from provenance test *E. grandis* established in 1974. After the thinning performed in 1992, the population comprised 242 trees in the central plot for 11 families (one family was totally eliminated) and 107 trees (mixing of 6 families) in borderlines (fig. 1, table 1).

Flowering phenology observations

The flowering status of the 242 central trees was assessed during five flowering seasons, from 1997 to 2001. We have only the individual flowering event for 1997 and 1998. From early April (day 95) to early September (day 254), i.e. from the first to the last flowers, the SSO was visited one to three times a week, in accordance with flower occurrences. Because of the difficulty of quantifying the number of flowers per tree, a tree was considered as flowering when opened flowers were clearly identifiable within the crown: each tree was then scored as 0 (without) or 1 (with). Data were recorded in a (0,1) matrix with individual trees and years as rows (242 x 3) and days of assessment as columns (159).

Figure 2

Figure 3

Because the annual flowering dynamics were equal between three years (fig. 2), we divided the flowering seasons into six classes: class A:]95-115], class B: [116-131], class C: [132-161], class D: [162-177], class E: [178-203] and class F: [204-254]. The class limits correspond to thresholds of 30, 60, 60, 30 and 10% of flowering trees (fig. 3). Each tree from the central plot was scored from A to F based on the classes in which flowers were observed. This approach allowed a comparison of the average phenology of the provenance and families.

Expected pollen cloud and variation along the flowering period

We hypothesized that the contribution of a tree to the pool of male gametes and to the pool of female gametes is identical and is estimated by the duration of the flowering.

D_{ijk} : is the duration (in days) of flower occurrence for tree i of provenance j during the period k

$\sum_i D_{ijk}$: total duration of flower occurrence for provenance j during period k .

$\sum_j \sum_i D_{ijk}$: total duration of flower occurrence during period k

$$(1) \quad P_{jk} = \sum_i D_{ijk} / \sum_j \sum_i D_{ijk} : \text{relative contribution to the pollen cloud or the ovule population from provenance } j \text{ during period } k \text{ (with } \sum_j P_{jk} = 1)$$

The probability of mating between two trees from two provenances during period k , assuming that there is self-fertilization and no preferential mating, is:

$$(2) \quad C_{jjk} = P_{jk}^2 \text{ (intra-provenance matings)}$$

$$(3) \quad C_{ij'k} = 2P_{jk} \times P_{j'k} \text{ (inter-provenance matings)}$$

$$(4) \quad \text{with } \sum C_{jjk} + \sum C_{ij'k} = 1$$

The annual contribution for provenance j was calculated by:

N_{jk} : flowered tree effective from provenance j for period k

$\sum_j N_{jk}$: total flowered tree effective during period k

$N_{jk} / \sum_j N_{jk}$: representation of provenance j for period k

$$(5) \quad C_{jjk} = (N_{jk} / \sum_j N_{jk})^2 : \text{intra-provenance mating occurrence for period } k$$

$$(6) \quad C_{jj'k} = 2(N_{jk} / \sum_j N_{jk})(N_{j'k} / \sum_j N_{j'k}) : \text{inter-provenance mating}$$

occurrence for period k

$$\sum_j N_{jk} / \sum_j \sum_k N_{jk} : \text{weight of period k}$$

$$(7) \quad C_{jj} + C_{jj'} = \sum_k ((\sum_j N_{jk} / \sum_j \sum_k N_{jk}) \times C_{jjk}) + \sum_k ((\sum_j N_{j'k} / \sum_j \sum_k N_{j'k}) \times C_{jj'k}) :$$

annual contribution for jth provenance assuming that there is no mating between the two periods.

Statistical analysis

Annual variations in flowering characters were assessed by ANOVA. The beginning, the end and the duration of flowering were assessed by a series of three-way mixed models using the GLM procedure with SAS version 6.12 (SAS 1989-1996), with factors: block, provenance and family in provenance. The multiple comparisons by Newman and Keuls tests were undertaken after ANOVA. Individual estimates of flowering characters for the three-year observation were subjected to analysis of variance according to the following model:

$$(8) \quad Y_{ijk} = \mu + \chi_i + \gamma_j + \alpha_k + \varepsilon_{ijk}$$

Where Y_{ijk} is the trait value of the tree in the kth block in provenance j in family i, μ is the overall experimental value, χ_i denotes the effect attributed to the ith family hierarchies in provenance, γ_j is the effect of provenance j, α_k is the effect associated with block k and ε_{ijk} is the residual of Y_{ijk} not accounted for by any the preceding terms. All effects except for the overall mean are considered to be random effects with variances $\sigma_{f(p)}^2$, σ_p^2 , σ_b^2 , σ_E^2 .

Results

The overall seed orchard flowering behavior

Each tree bloomed over a period of 1 to 14 weeks, with an average of 7-8 weeks. Three consecutive years of seed orchard flowering tree percentages are reported in fig. 2. The flowering used to start in early April (around day 100) and finished in late August (around day 240) with a maximum between late May and early June. The overall profile was similar for the 3 years, with differences mostly occurring in the percentage. At day 135 it reached 90% in 1999 but only 65% in 2000 (after a partial fire in November 1999) with an intermediate value of 80% in 2001.

These data clearly indicated that the flowering peaks and the curve shapes were similar year by year. On this basis, we assumed that it was possible to merge the data and to calculate the flowering mean for the 3 years. The result is shown in fig. 2 where we also split the phenomenon into 6 phases (A to F) corresponding to the threshold of 30, 60, 60, 30 and 10% of flowering trees.

Specific behavior of several provenances and families

Table 2

Provenance and family behaviors, from 1997 to 2001, are reported in table 2. The provenance flowering percentages ranged between 64 and 100%, with a low inter-annual variability.

Table 3

Table 4

Results of a detailed analysis of variance for flowering start, flowering end and flowering duration were conducted over three years for five provenances corresponding to 11 families (table 3). Dates of flowering start and end showed a

significant or highly significant provenance effect during the three years of observations. The Andranokobaka and Atherton trees appeared significantly more precocious while those of Paluma were late (table 4). The results showed no intra-provenance differences. In general, there were no inter-provenance differences in flowering duration. A significant difference was only recorded, in 1999, for Paluma, which had a longer flowering duration.

Expected pollen cloud composition according to flowering phase

The potential contribution to the pollen cloud for one season was given by the effective size and contribution of each origin, in terms of flowering trees/day. From one year to another, we did not observe any deviation from the potential contributions, which were Andranokobaka (35%), Atherton (20%), Tinaroo (20%), Ravenshoe (20%) and Paluma (5%), in accordance with their effective size in the seed orchard.

Figure 3

According to the annual overall flowering behavior, we defined six flowering phases (A-F). Fig. 3 shows the probabilities of co-flowering within and between provenances giving a view of putative crosses within and between origins. During phases A and B, cross-probabilities were maximum within and between the Andranokobaka and Atherton origins, more than 50%. The situation appeared more balanced during phases C and D when Tinaroo and Ravenshoe trees were also involved. At the end, during phases E and F, there was a disequilibrium involving Ravenshoe and Paluma. In conclusion, there was no global difference between the three years but there was a real risk of co-flowering among the provenances. Our results show that the phenological differences within the seed orchard are repeated identically year on year. This potentially reflects the existence of preferential crosses, depending on the period of flowering.

Discussion

In the ecological conditions of Madagascar, phenological observations were carried out over three consecutive years in a seed orchard of *E. grandis*. The results showed good flowering levels with similar behavior for the three years. Nevertheless, constant differences were observed according to origins, suggesting possible pollination bias.

Overall flowering behavior of *Eucalyptus grandis* seed orchard in Madagascar

In this seed orchard, the flowering period started in April and finished in early September, with similar patterns over three years. For such trees, vegetative growth and the reproductive phase are associated with seasonal changes in climatic conditions such as temperature, rainfall, day length, and solar radiation. In Madagascar, the general climatic conditions in the experimental site were similar to those occurring in the northern part of the natural area of *E. grandis* (Central Queensland). In this kind of seasonal climate - 1500 mm of summer rainfall - the exotic *E. grandis* is expected to flower during the summer season with reduced vegetative growth (Law et al. 2000). The *E. grandis* flowering season occurs towards the end of the growing period from late summer to winter, i.e. April to August with few trees displaying flowers in March or September. In Australia or in South Africa, under the same conditions, the flowering occurs at the same period (Hodgson 1976, Law et al. 2000, Jones and van Staden 2001). This was the situation observed in our experiment, consequently, *E. grandis* flowering behavior in Madagascar could be considered as normal and regular.

In the SSO, trees were observed when they were 10 to 14 years old. They could be considered as sexually mature before 10 years. The five-year survey clearly showed very similar flowering dates with a maximum occurring in May. According to the year, from 70 to 95% of the population flowered. This could not be considered as particular abundance or paucity. If we refer to Ashton (1975), this case, at a population level, could be the result of rare coincidence of independent individual tree cycles. Some authors showed that cycles of high and

low flowering intensities occurred as well as variation in the number of plants involved during long observation periods (Dale and Hawkins 1983, Setterfield and Williams, Law et al. 2000). The SSO situation was good during the last 3-5 years and certainly harvesting on 10-year-old trees should be recommended to breeders.

Flowering asynchrony among origins

Early and late flowering origins were clearly demonstrated. Atherton and Andranokobaka flowered early while Paluma was late. This behavior, if not taken into account, could bias the SSO strategy. Eucalyptus are known for their within-species variability in the flowering patterns (day of first, maximum, last and total flowering period length) of individual trees (Beardsell et al. 1993, Florence 1996), although few detailed or long-term phenological studies (as Dale and Hawkins 1983 or Law et al. 2000) have been published.

These provenance differences, plus their constancy over the years, suggest a strong genetic control of flowering traits, probably related to ecological adaptation. The Paluma origin, unimproved, was recently introduced. Its poor development and delayed flowering were certainly due to poor adaptation to local conditions. In contrast, Andranokobaka was harvested on Atherton mother trees located in a nearby provenance test area. The previous selection, based on growth character, has certainly influenced, more or less directly, the selection for precocious individuals. This characteristic enhanced precocious trees, because the applied selection rate is lower and it tends to be globally dominant. This precocious pattern could have been increased by a greater access to the light as suggested by House (1997). In conclusion, it is very important to integrate this differential behavior when constituting SSO and then the seed samples.

The improvement of the SSO seed sample

The main objectives of the SSO procedure are to assure maximum intercrosses among origins but it is difficult to manage this without objective characters such as molecular markers.

In order to survey gene flow within this SSO, Chaix et al. (in press) performed paternity test analysis on 724 plantlets from a harvest carried out on 30 mother trees. The results showed, for this sample, a large pollen donor contribution (199 on 349 genitors) and therefore a good genetic admixture. A 97% outcrossing rate with a large portion (39%) of pollen coming from outside the SSO was recorded. In addition, a reproductive bias, involving inter-origin preferential mating, was suspected. Origins of Malagasy provenance were over-represented while those of the Ravenshoe provenance were under-represented. These results could be explained on the one hand by the great number of progeny fathered by trees of Malagasy provenance and on the other hand by the late differential flowering behavior. A greater number of harvests were done on Andranokobaka trees because their phenology was closer between trees of the same provenance. The Paluma was under-represented both because of its late flowering and low frequency in the SSO. In addition, the high flowering level of the SSO confirmed the observed genetic admixture, with molecular markers and paternity analysis.

Consequences for seed orchard and selection scheme management

The seed orchard is a common way of producing improved varieties cheaply. Eucalypts, with large numbers of flowers visited by a wide range of pollinator taxa and preferential outcrossing mating system, is particularly adapted to orchards. Genetic improvement through breeding seedling seed orchards could be achieved through genetic thinning and/or selective harvesting, applying selection to both sexes or only to the seed's parents. Especially when exotic trees are considered, knowledge of phenology is needed to ensure mating between genotypes. Even though phenology processes are largely controlled by local climatic conditions, response to seasonal variations could change from genotype to genotype, leading to early, normal or late flowering trees. Consequently,

generation-to-generation, this could progressively disconnect early and late flowering cohorts. In such conditions, random mating will not be ensured and the expected genetic gain will never be achieved.

This is of particular importance when crosses between origins are expected. The building up of a breeding population, both encompassing broad genetic diversity and providing improved traits such as growth, stem form and wood quality, could be improved when desirable traits are picked from a wide range of provenances with specific flowering habits. Even though the heritability of flowering traits remains largely unknown, phenology data could be used, in addition to economically desirable traits, as a conservative strategy to select appropriate parental genotypes for commercial seed production and breeding. Gene flow between selected trees, as well as protection against pollen pollution, could be enhanced by a combination of culling and selective harvesting, as demonstrated by the *E. grandis* seed orchard. Individual trees could be ranked according to their flowering period. The earliest and latest flowering trees are culled in order to sharpen the flowering period in the next generation. The semi-early and semi-late flowering trees are retained to ensure a heavy pollen cloud (so they participate to the next generation as male parents), but must not be harvested as they potentially catch alien pollen.

In conclusion, this study demonstrates that, in Madagascar, *E. grandis* is well adapted to local environmental conditions regarding flowering habits. The overall flowering behavior is regular with a sharp peaking of flower occurrence. The use of the SSO strategy associated with open pollination, as a main process for commercial seed production and breeding, is possible. Nevertheless, the behavior of each origin must be accurately observed. It is of real importance to avoid unbalanced contributions to the mating events. We suggest that seeds should be harvested only on trees flowering during the peak of the season. Molecular markers, according to the objectives and available funds, could help to monitor part or all of the procedure.

Acknowledgements

This paper represents a portion of the doctoral research of G. Chaix supported by Cirad-forêt. We wish to thank F. Rasolo, Y. Rabenantoandro, H. Randrianjafy (Fofifa), R. Rabetsoa (Fanalamanga) and A. Charrier (Ensam) for agreeing to conduct this work in Madagascar, especially J. Rakotondrasoa and E. Rakotoarisoa for their field works. D. Marsh is acknowledged for revising our English.

Bibliography

- Ashton DH, 1975. The development of even-age stands of *Eucalyptus regnans* F. Muell. in central Victoria. *Australian Journal of Botany* **24**, 397-414.
- Beardsell DV, O'Brien SP, William EG, Knox RB, Calder DM (1993) Reproductive biology of Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany*, **41**, 511-526.
- Chaix G, Ramamonjisoa L (2001) Production de semences pour les reboisements malgaches. *Bois et Forêts des Tropiques*, **269**, 49-63.
- Chaix G, Gerber S, Razafimaharo V, Vigneron P, Verhaegen D, Hamon S (in press) Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. *Theoretical and Applied Genetics*.
- Dale J, Hawkins P (1983) Phenological studies of spotted gum in southern inland Queensland. *Technical paper, Department of forestry, Queensland*, **35**, 10.
- Florence RG (1996) The biology of the eucalypt forest. In 'The Biology of Australian Plants'. (Eds JS Pate and AJ McComb.) University of Western Australia Press: Nedlands, pp147-180.
- Hardi T, Kalso (1995) The role of European honey bees (*Apis mellifera* L.) in the pollination of a plantation of a eucalypt plantation in Pati. *Honeybee Science*, **16(1)**, 24-26.
- Hingston AB, Potts BM (1998) Floral visitors of *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* in eastern Tasmania. *Tasforests*, **10**, 125-139.
- Hodgson LM (1976) Some aspects of flowering and reproductive behavior in *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden at JDM Keet Forest Research Station: 2. Flowering, controlled pollination methods, pollination and receptivity. *South African Forestry Journal*, **97**, 18-28.
- House SM (1997) Reproductive biology of eucalypts. In 'Eucalypt ecology: individuals to ecosystems'. (Eds JE Williams, JCZ Woinarski) pp. 30-55. (Cambridge University Press: Melbourne).
- Jones WR and van Staden J, 2001 The reproductive sequences of four important commercial Eucalyptus species in South Africa. In: *Proceedings developing the eucalypt of the future, IUFRO International Symposium 10-15 September 2001*, pp.133, Valdivia, Chile.
- Kang KS, Lindgren D (1998) Fertility variation and its effect on the relatedness of seeds in *Pinus thunbergii* and *Pinus koraiensis* clonal seed orchards. *Silvae Genetica*, **47**, 196-201.
- Law B, Mackowski C, Schoer L, Tweedie T (2000) Flowering phenology of myrtaceous trees and their relation to climatic, environmental and disturbance variables in northern New South Wales. *Austral Ecology* **25(2)**: 160-178.
- Lebot V, Ranaivosoa L (1994) *Eucalyptus* genetic improvement in Madagascar. *Forest Ecology and Management*, **63**, 135-152.
- Moncur MW, Charles R., Kleinschmidt GJ (1993) Can honeybees increase seed production in blue gum, *Eucalyptus globulus* ? *Australian Beekeeper*, **95**, 248-253.
- Moncur MW, Mitchell A, Fripp Y, Kleinschmidt GJ (1995) The role of honey bees (*Apis mellifera*) in eucalypt and acacia seed production areas. *Commonwealth Forestry Review*, **64**, 350-354.
- Moncur MW, Boland DJ (2000) Production of genetically improved *Eucalyptus nitens* seed for reforestation. *Australian Forestry*, **63(3)**, 211-217.
- Plomion C, LeProvost G, Pot D, Vendramin G, Gerber S, Decroocp S, Brach J, Raffin A, Pastuszka P (2001) Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. *Canadian Journal of Forest Research*, **31**, 1816-1825.
- Pryor LD (1976) *The biology of Eucalypts*. Edwards Arnold, London.
- Razafimaharo V (2000) Analyse des flux géniques par pollen à l'aide de marqueurs microsatellites dans un verger à graines d'*Eucalyptus grandis* à Madagascar. DEA Université Antananarivo, 101p.
- SAS (1989-1996) Windows version 6.12. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.

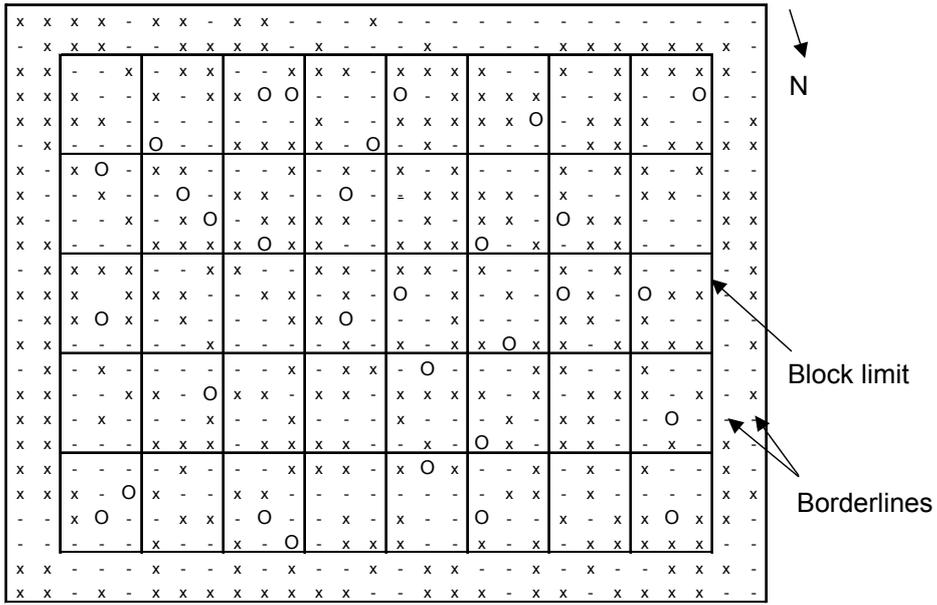
Setterfield S, Williams R (1996) Patterns of flowering and seed production in *Eucalyptus miniata* and *E. tetradonta* in a tropical savanna woodland, northern Australia. *Australian Journal of Botany*, **44**(2), 107-122.

Figure legends

Fig. 1 Map of the *E. grandis* seed orchard.

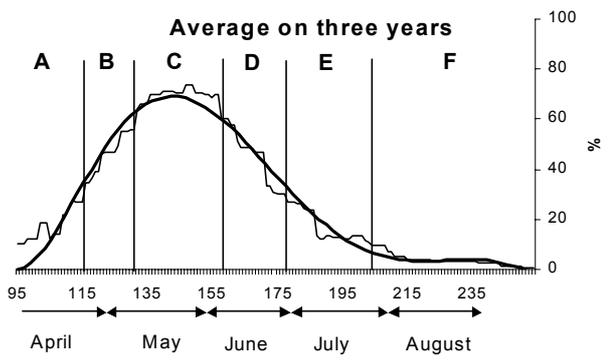
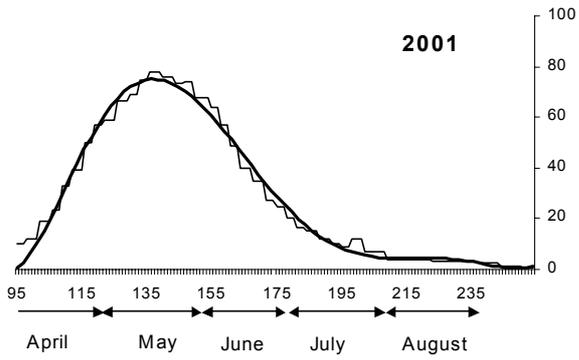
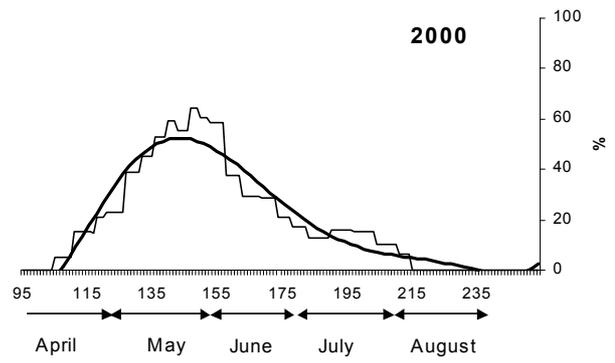
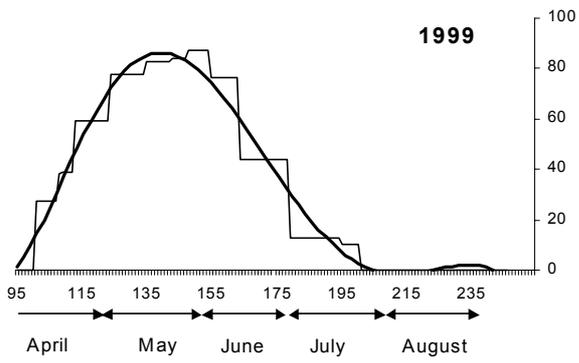
Fig. 2 Flowering tree percentages in the seed orchard for three years and mean of flowering tree percentage for three years. A, B, C, D, E, F periods were defined by thresholds of 30, 60, 60, 30 and 10% of flowering trees.

Fig. 3 Probabilities of co-flowering within and between provenances from seed orchards during the six predefined periods (Andra: Andranokobaka, Ather: Atherton, Tinar: Tinaroo, Raven: Ravenshoe, Palum: Paluma). The number of flowering trees was respectively 67, 143, 206, 138, 78, 24 for periods A, B, C, D, E, F.



x Tree place o Maternal trees - free place due to thinning

←————→
15 metres



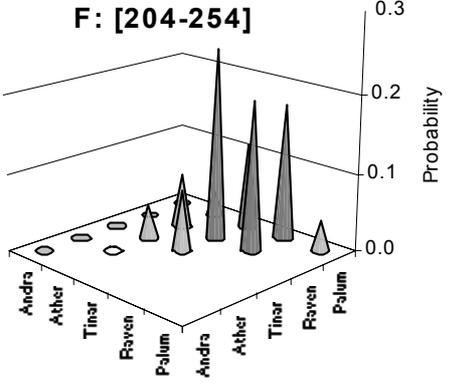
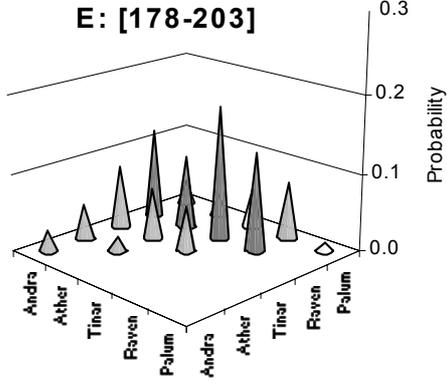
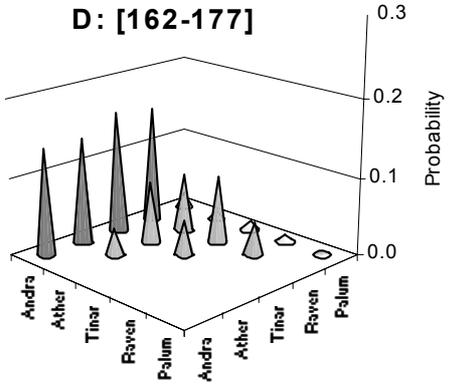
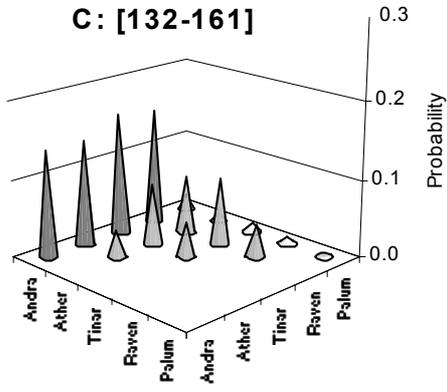
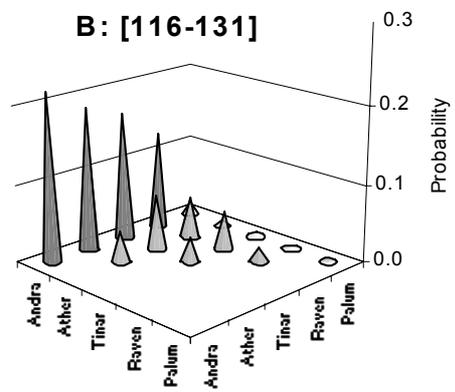
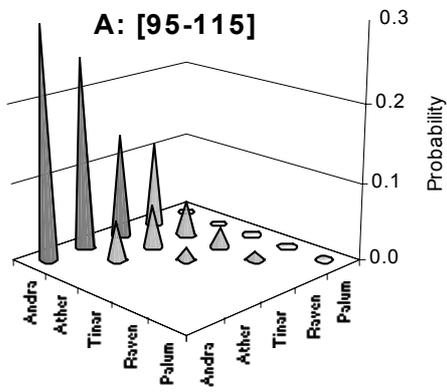


Table 1 Description of *Eucalyptus grandis* provenances.

Provenance	Country	Latitude S	Longitude E	Elevation (m)	Central plot effective size	Border lines effective size	Total effective size	%
Andranokobaka	Madagascar	18°56'	48°14'	900	83	93	176	50,4
Atherton	Australia Qld	17°15'	145°42'	800	45	2	47	13,4
Tinaroo	Australia Qld	17°11'	145°36'	900	46	0	46	13,2
Ravenshoe	Australia Qld	17°42'	145°28'	940	59	3	62	17,8
Paluma	Australia Qld	19°00'	146°00'	900	9	1	10	2,8
Unknown	-	-	-	-	0	8	8	2,3
Total	-	-	-	-	242	107	349	100

Table 2 Percentage of flowering trees for provenance and family over five years.

Provenance	1997	1998	1999	2000	2001
Andranokobaka	88	96	95	78	96
Atherton	87	89	89	76	98
Tinaroo	80	89	98	80	96
Ravenshoe	75	80	93	71	86
Paluma	67	89	100	67	89
Total	82	89	96	76	94

Table 3 Results of variance analysis for flowering character.

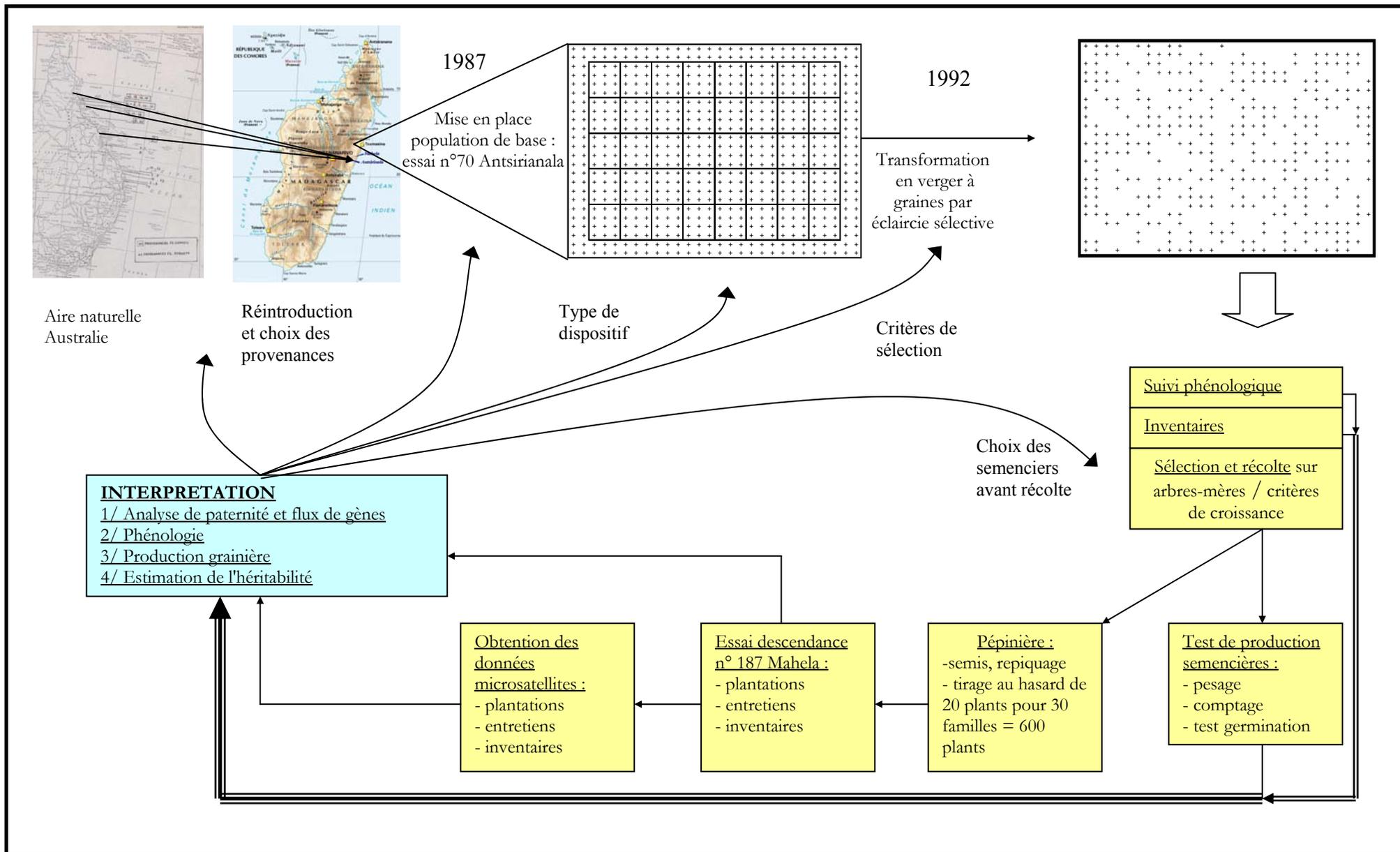
Source	Flowering start		Flowering end		Flowering duration		
	df	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
1999							
Provenance	4	9.06	0.0001	11.87	0.0001	2.81	0.0270
Family (provenance)	6	2.12	0.0537	0.39	0.8867	0.56	0.5578
2000							
Provenance	4	9.05	0.0001	3.32	0.0124	0.56	0.6945
Family (provenance)	6	3.09	0.0072	1.34	0.2429	1.45	0.1993
2001							
Provenance	4	7.73	0.0001	10.89	0.0001	0.59	0.6724
Family (provenance)	6	0.90	0.4980	1.04	0.4003	0.76	0.6003

Table 4 Mean comparison with Newman and Keuls test (flowering start and end are expressed as day, flowering duration as day number, with the same letter they were not significantly different).

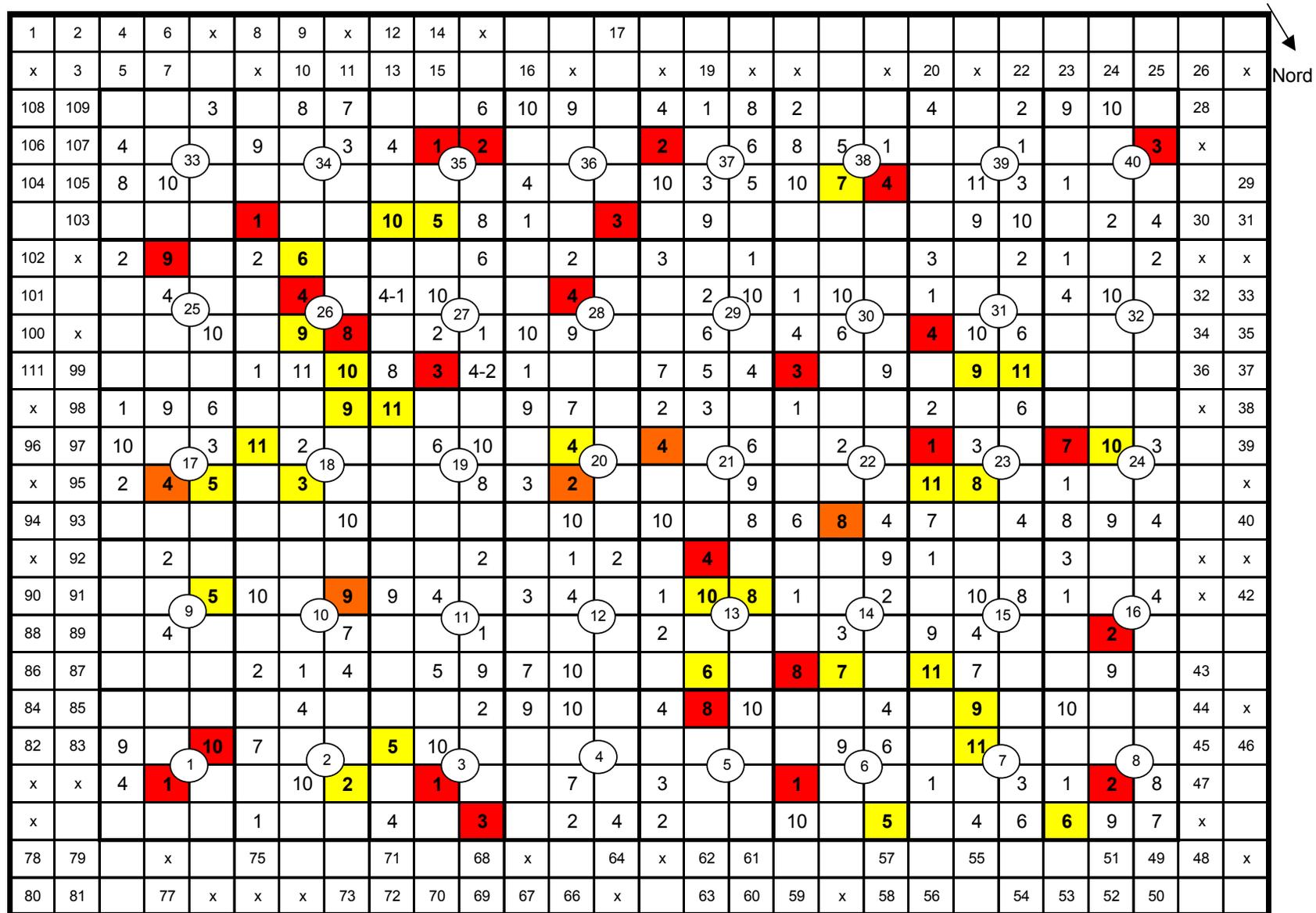
Year	Provenance	Flowering start	Flowering end	Flowering duration
1999	Andranokobaka	118 ^b	174 ^c	56 ^b
	Atherton	125 ^{ab}	176 ^c	51 ^b
	Tinaroo	122 ^{ab}	182 ^{bc}	58 ^b
	Ravenshoe	131 ^a	187 ^b	53 ^b
	Paluma	126 ^{ab}	204 ^a	74 ^a
2000	Andranokobaka	121 ^c	169 ^b	42 ^a
	Atherton	128 ^{bc}	170 ^b	36 ^a
	Tinaroo	130 ^{bc}	181 ^{ab}	43 ^a
	Ravenshoe	133 ^b	181 ^{ab}	38 ^a
	Paluma	147 ^a	181 ^a	43 ^a
2001	Andranokobaka	111 ^d	162 ^c	49 ^a
	Atherton	114 ^{cd}	168 ^{bc}	51 ^a
	Tinaroo	122 ^{bc}	175 ^b	51 ^a
	Ravenshoe	129 ^b	178 ^b	44 ^a
	Paluma	142 ^a	205 ^a	57 ^a

ANNEXES

Annexe 1. Description des différentes étapes depuis les populations d'origine dans l'aire naturelle jusqu'à l'intégration des résultats de notre étude



Annexe 3. Plan et situation du verger à graines d'*E. grandis* au moment de l'étude



④ Numéro de bloc

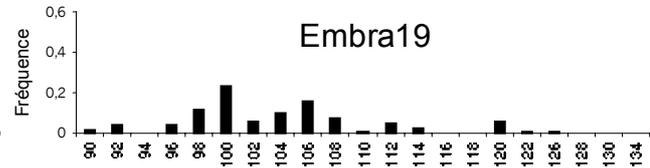
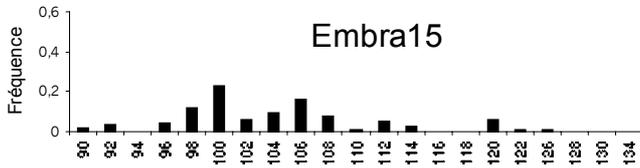
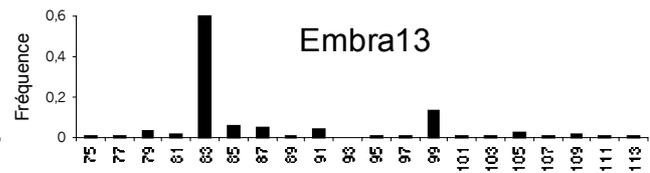
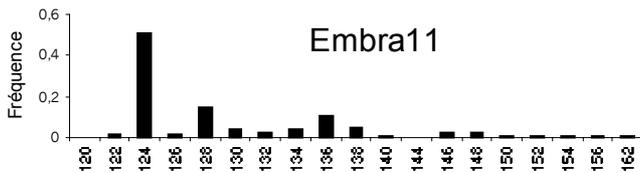
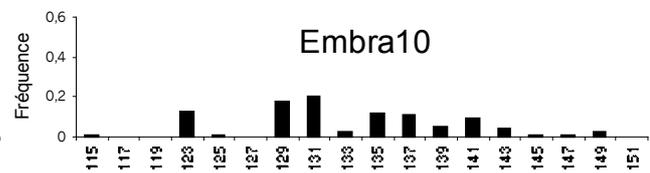
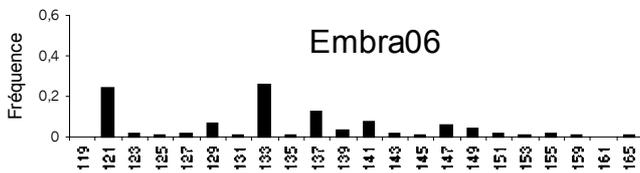
1 Parcelle unitaire bloc monoarbre

1 3 Arbres concernés par l'étude

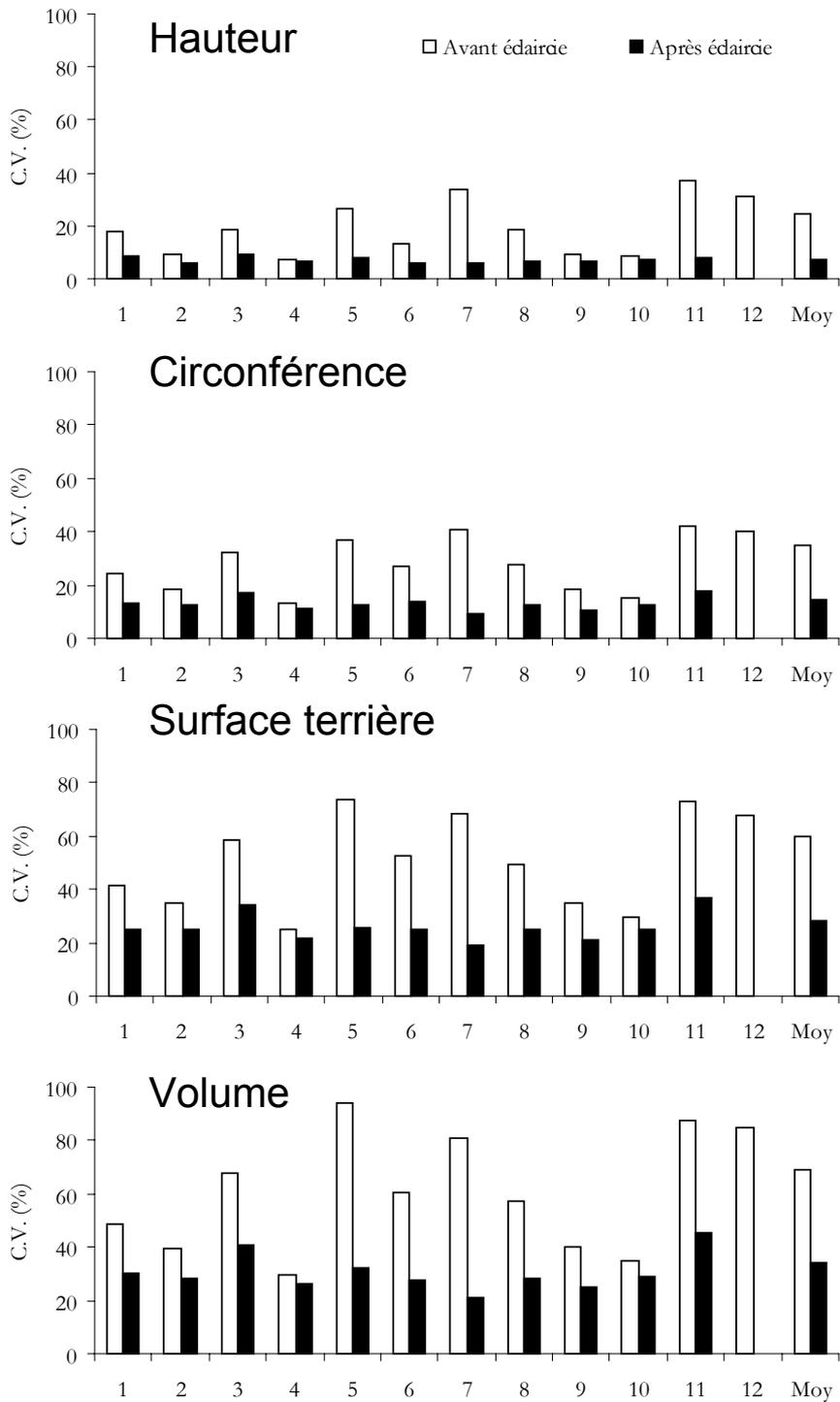
Annexe 4. Fréquences alléliques des six locus dans la population parentale

Locus	Embra06	Embra10	Embra11	Embra13	Embra15	Embra19
1	<u>0,0000</u>	0,0044	<u>0,0000</u>	0,0044	0,0199	0,0044
2	0,2399	<u>0,0000</u>	0,0130	0,0044	0,0380	0,0039
3	0,0129	<u>0,0000</u>	0,5058	0,0344	<u>0,0000</u>	<u>0,0000</u>
4	0,0044	0,1307	0,0159	0,0143	0,0435	0,0287
5	0,0145	0,0043	0,1460	0,6017	0,1159	0,0963
6	0,0636	<u>0,0000</u>	0,0390	0,0544	0,2319	0,1868
7	0,0043	0,1796	0,0217	0,0501	0,0598	0,0115
8	0,2587	0,2011	0,0448	0,0100	0,0960	<u>0,0000</u>
9	0,0101	0,0287	0,1040	0,0444	0,1612	0,5302
10	0,1214	0,1149	0,0491	<u>0,0000</u>	0,0725	0,1336
11	0,0347	0,1135	0,0044	<u>0,0044</u>	0,0054	0,0057
12	0,0780	0,0474	<u>0,0000</u>	0,0044	0,0507	0,0049
13	0,0130	0,0920	0,0231	0,1332	0,0236	<u>0,0000</u>
14	0,0058	0,0417	0,0275	0,0072	0,0036	<u>0,0000</u>
15	0,0592	0,0086	0,0044	0,0043	0,0038	
16	0,0405	0,0072	0,0054	0,0215	0,0580	
17	0,0159	0,0287	0,0049	0,0044	0,0054	
18	0,0101	<u>0,0000</u>	0,0044	0,0129	0,0048	
19	0,0202		0,0044	0,0049	0,0036	
20	0,0044			0,0044	0,0036	
21	0,0039				0,0036	
22	0,0054					

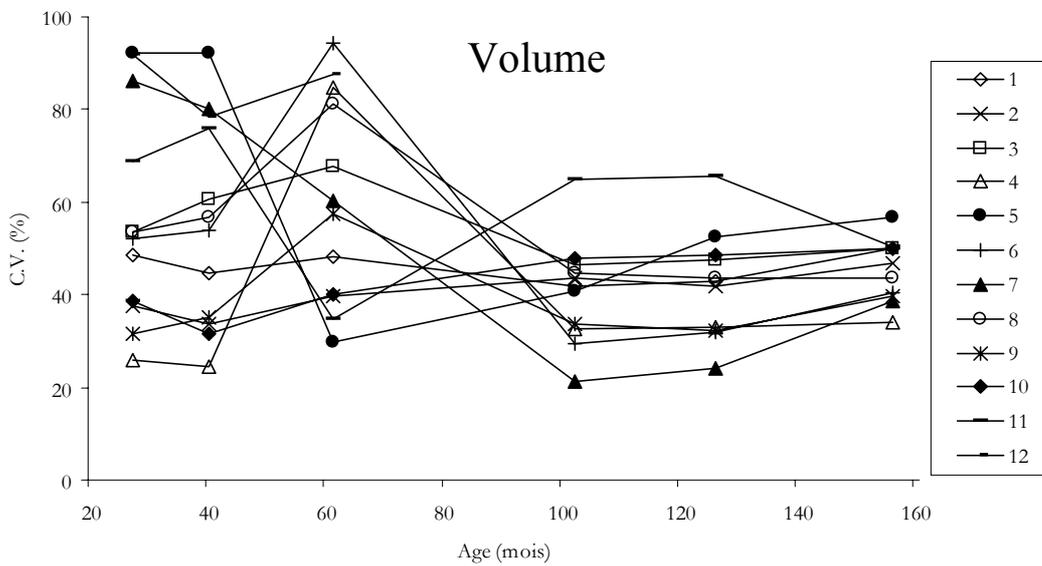
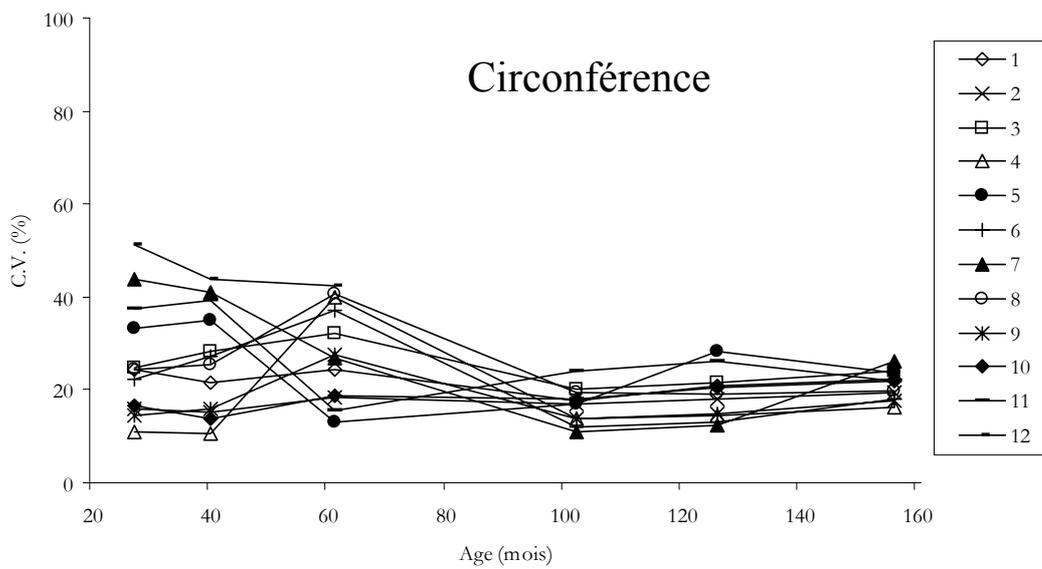
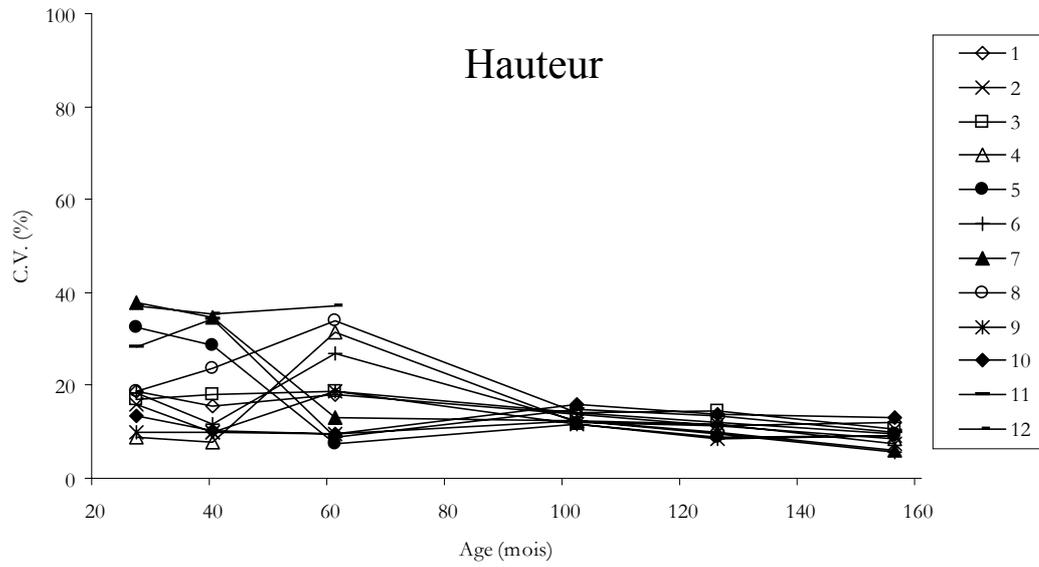
Souligné : allèles absents dans la population parentale et présents dans la descendance



Annexe 5. Evolution des coefficients de variation intra famille de la hauteur, de la circonférence, de la surface terrière individuelle et du volume au moment de l'éclaircie

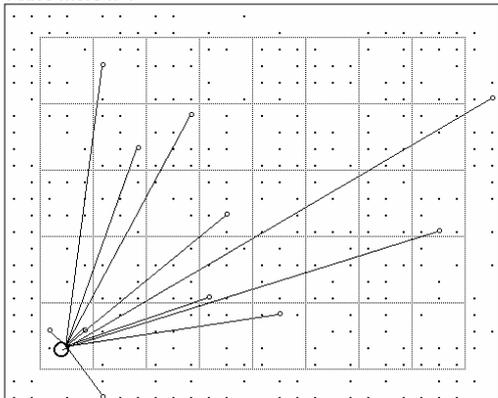


Annexe 6. Evolution de la variabilité intra famille de 27 à 156 mois de la hauteur, de la circonférence et du volume

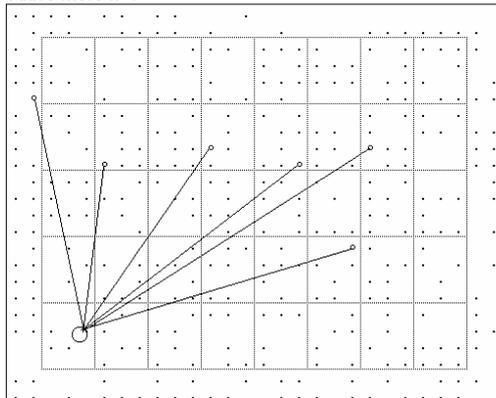


Annexe 7. Cartes de dispersion pollinique pour les 30 arbres-mères

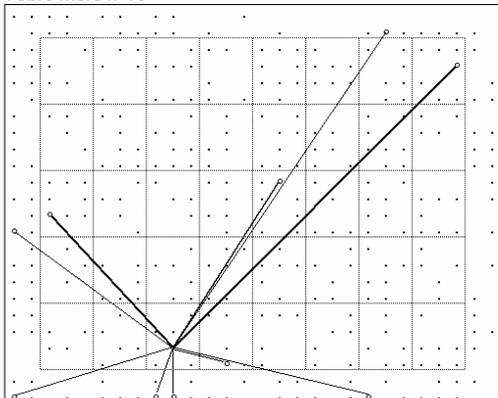
Arbre mère n°1



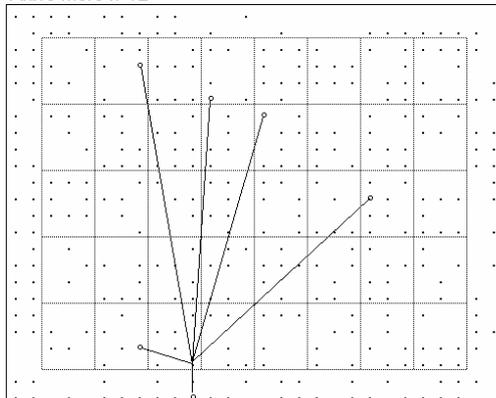
Arbre mère n°4



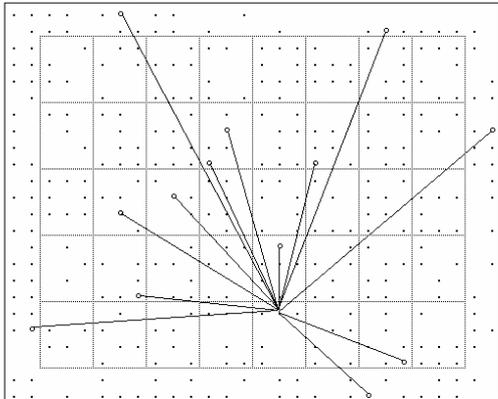
Arbre mère n°10



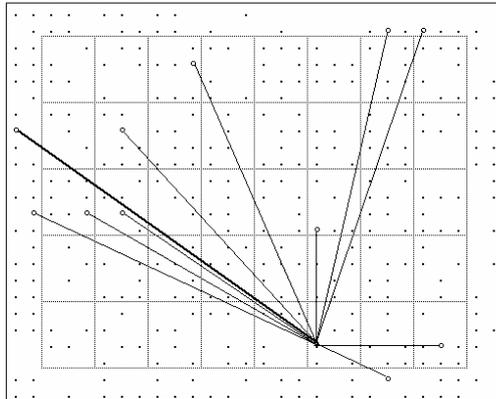
Arbre mère n°12



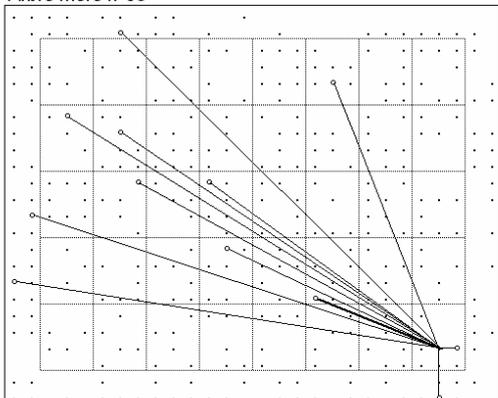
Arbre mère n°24



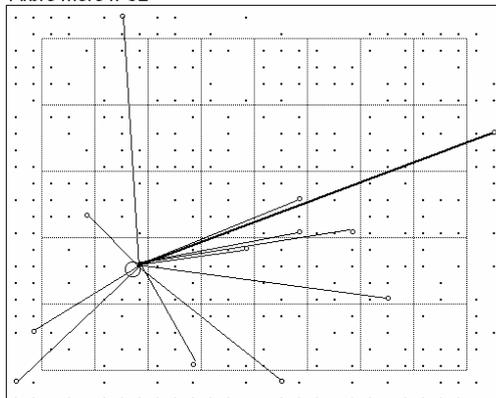
Arbre mère n°26



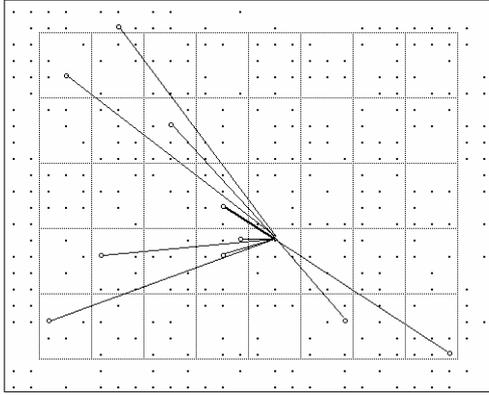
Arbre mère n°39



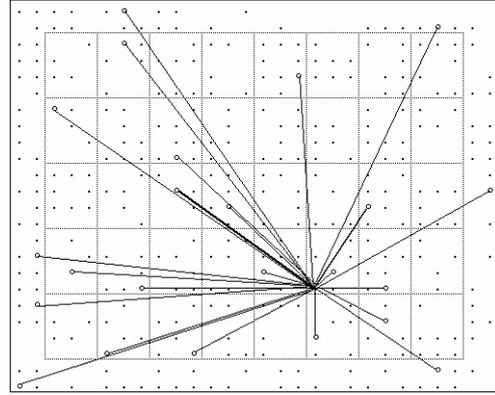
Arbre mère n°52



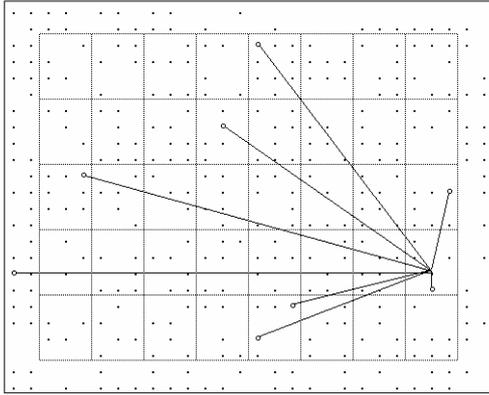
Arbre mère n°68



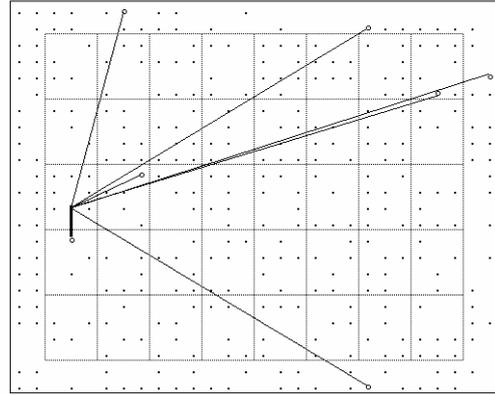
Arbre mère n°76



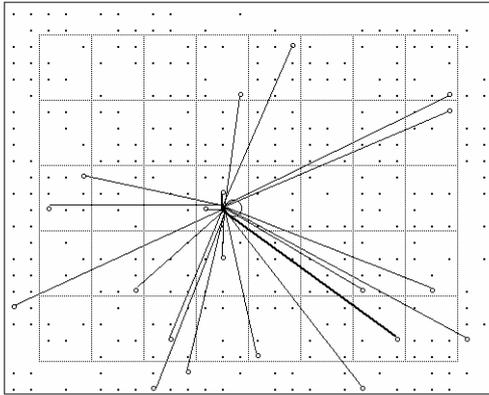
Arbre mère n°86



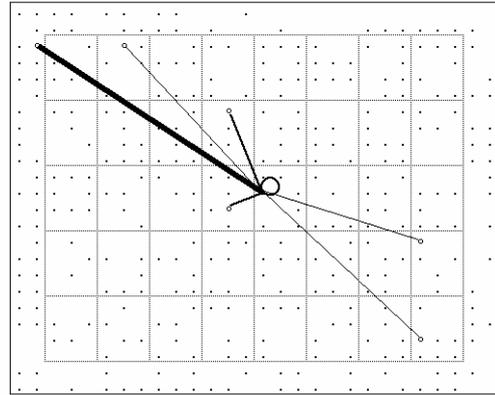
Arbre mère n°93



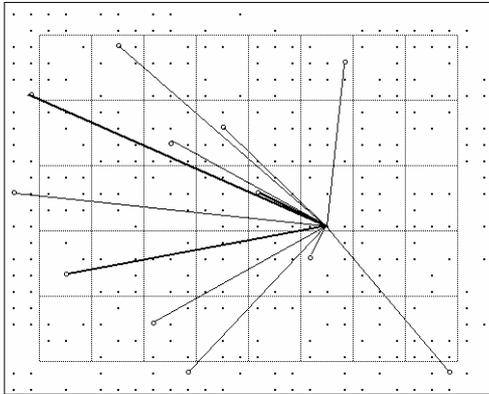
Arbre mère n°107



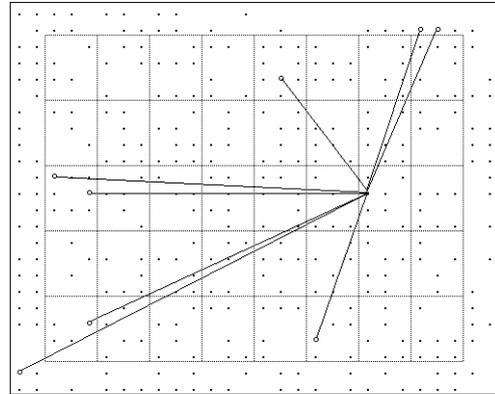
Arbre mère n°115



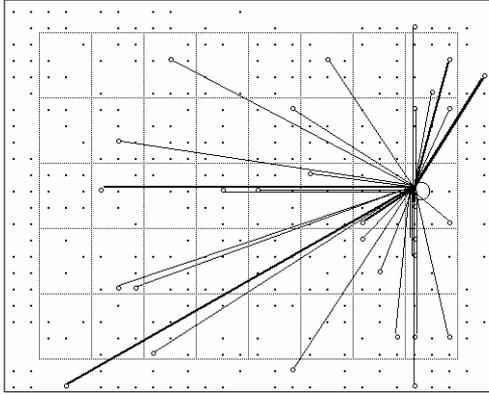
Arbre mère n°124



Arbre mère n°125

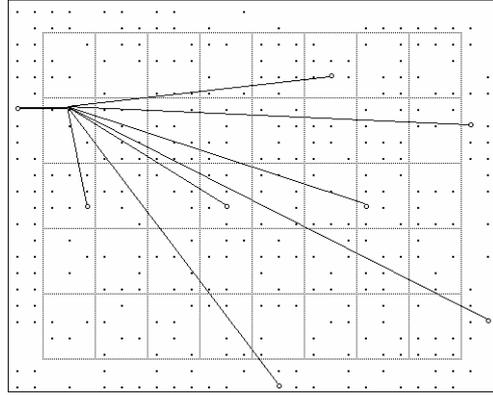


Arbre mère n°136



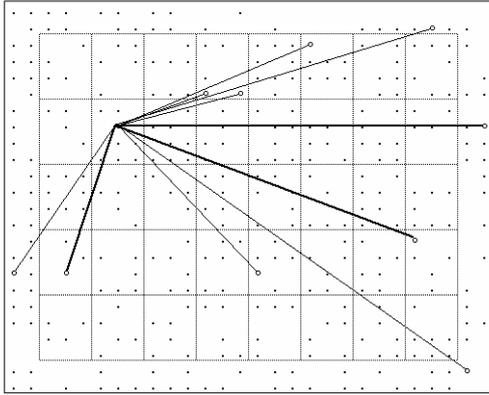
← 35%

Arbre mère n°142



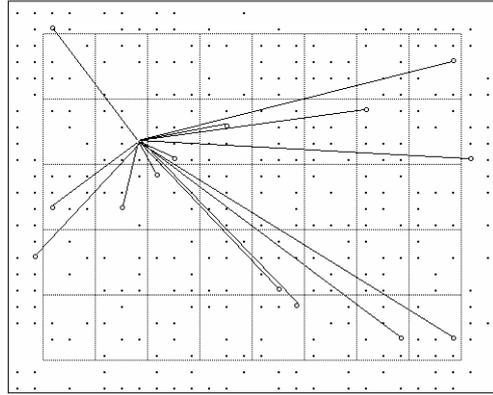
← 53%

Arbre mère n°146



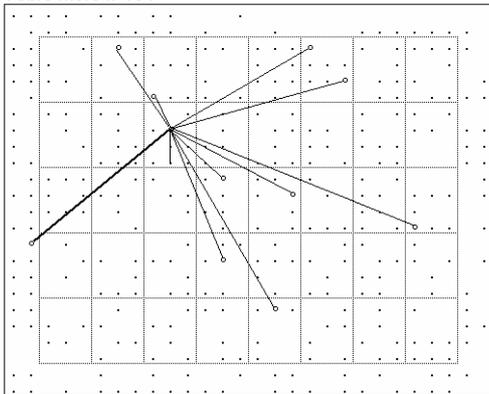
← 35%

Arbre mère n°148



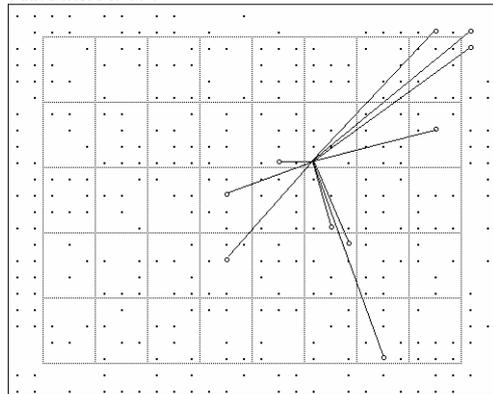
← 26%

Arbre mère n°154



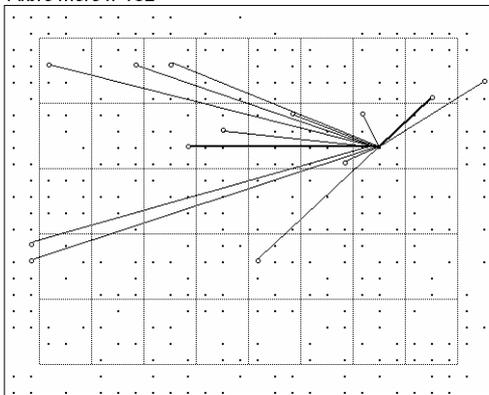
← 30%

Arbre mère n°174



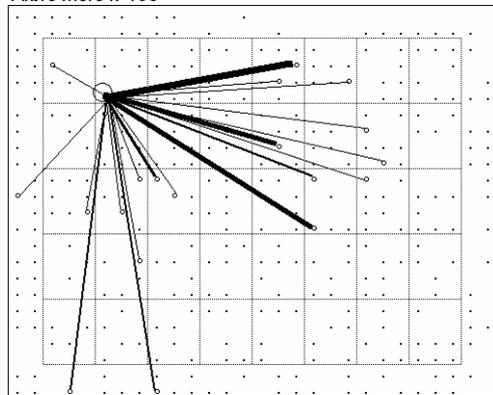
← 47%

Arbre mère n°182



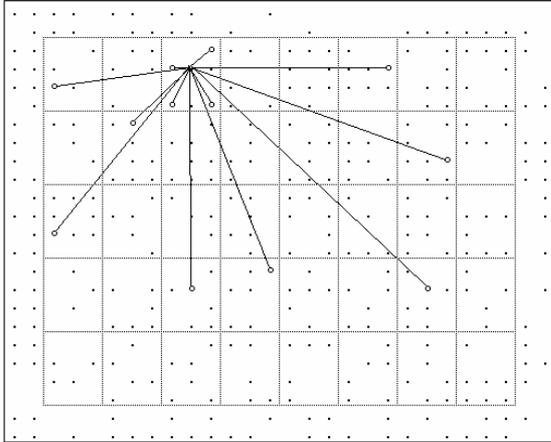
← 32%

Arbre mère n°195

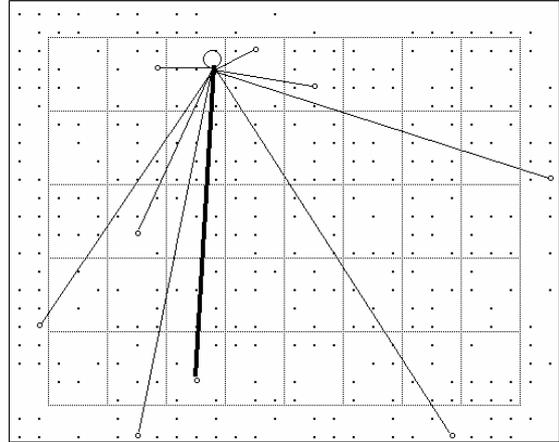


← 32%

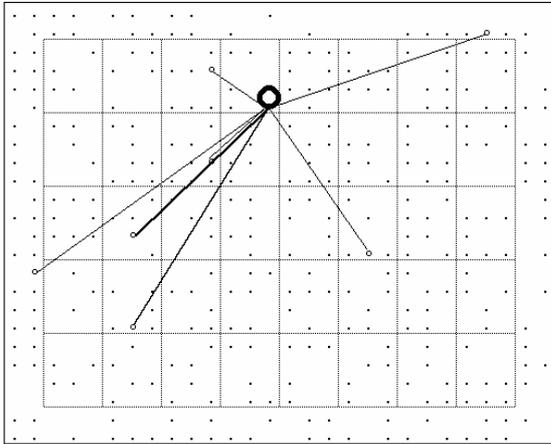
Arbre mère n°201



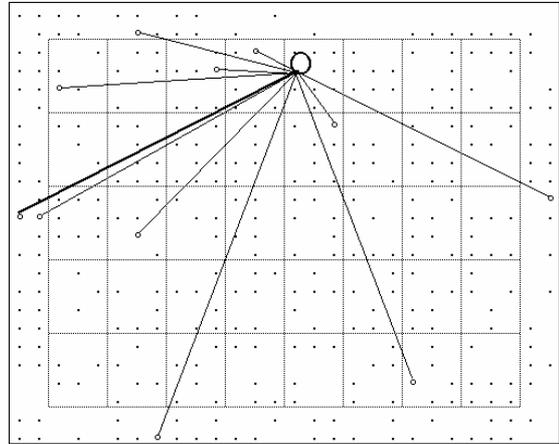
Arbre mère n°202



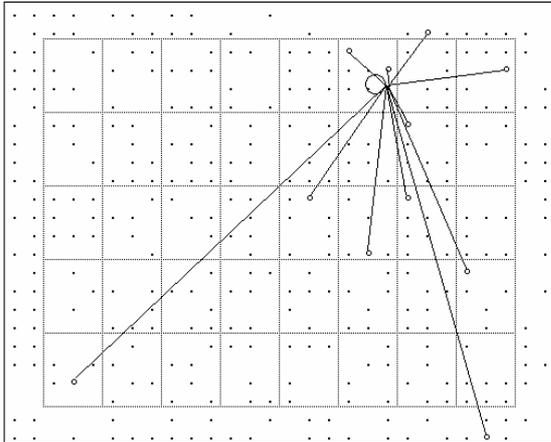
Arbre mère n°209



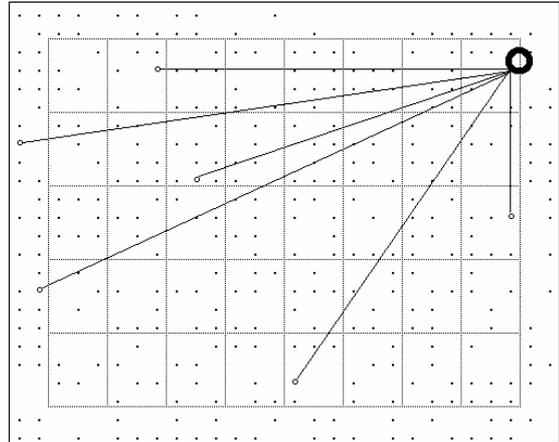
Arbre mère n°213



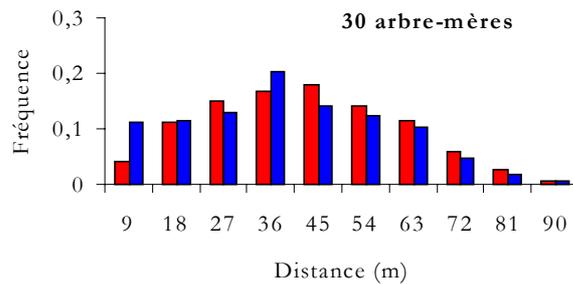
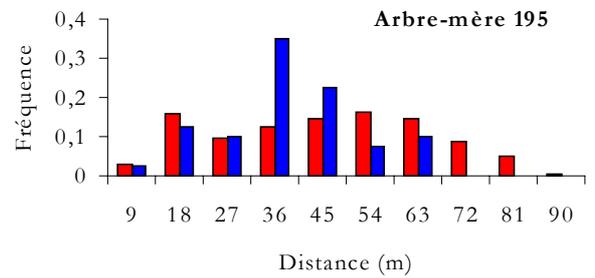
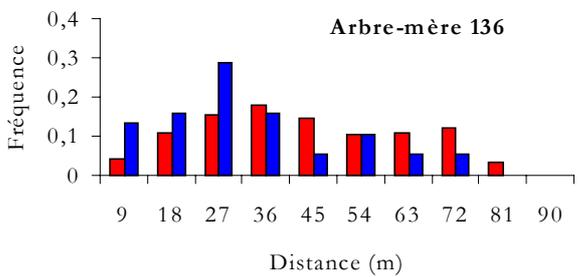
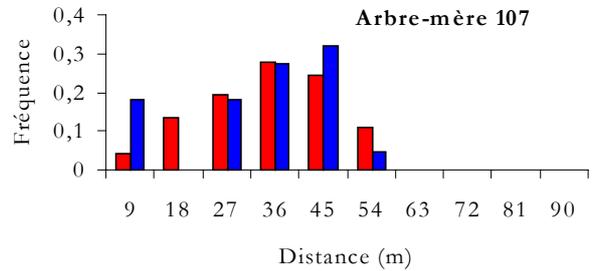
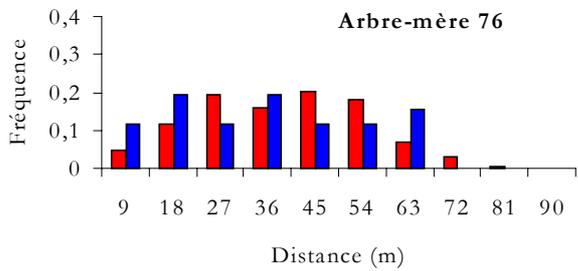
Arbre mère n°225



Arbre mère n°239



Distributions des pères potentiels et des pères observés - Un test de comparaison de Mann-Whitney-Wilcoxon est utilisé pour observer le décalage vers la gauche de la distribution des pères observés. Les arbre-mères 136 et 195 présentent des déviations significatives au seuil de 5% entre les deux distributions des pères potentiels et observés



■ Pères potentiels ■ Pères réels

Annexe 9. Fréquences alléliques des six locus dans la population de descendants

Locus	Embra06	Embra10	Embra11	Embra13	Embra15	Embra19
1	0,0014	<u>0,0000</u>	0,0114	0,0042	0,0039	0,0015
2	0,2536	0,0043	<u>0,0000</u>	0,0014	0,0019	0,0015
3	0,0143	0,0014	0,4750	0,1287	0,0058	0,0015
4	0,0043	0,1382	0,0228	0,0545	0,0116	0,0682
5	0,0029	0,0057	0,1698	0,4210	0,2042	0,0450
6	0,0759	0,0043	0,0471	0,0657	0,2408	0,1742
7	0,0014	0,1567	0,0128	0,0308	0,0674	0,0203
8	0,2579	0,1610	0,0371	0,0140	0,2197	0,0015
9	0,0100	0,0470	0,1355	0,0573	0,0751	0,5080
10	0,0931	0,1011	0,0357	0,0042	0,0713	0,1640
11	0,0387	0,1211	0,0014	0,0112	0,0289	0,0044
12	0,1117	0,0812	0,0057	0,0042	0,0270	0,0029
13	0,0215	0,1097	0,0185	0,1720	0,0077	0,0015
14	<u>0,0000</u>	0,0214	0,0200	0,0042	<u>0,0000</u>	0,0058
15	0,0444	0,0057	<u>0,0000</u>	0,0056	<u>0,0000</u>	
16	0,0444	0,0171	0,0057	0,0126	0,0328	
17	0,0072	0,0228	<u>0,0000</u>	0,0084	<u>0,0000</u>	
18	0,0086	0,0014	0,0014	<u>0,0000</u>	<u>0,0000</u>	
19	0,0043		0,0000	<u>0,0000</u>	<u>0,0000</u>	
20	0,0014			<u>0,0000</u>	<u>0,0000</u>	
21	0,0029				0,0019	
22	<u>0,0000</u>					

Souligné : allèles absents dans la descendance et présents dans la population parentale

Etude des flux de gènes dans un verger à graines d'*Eucalyptus grandis* à Madagascar

Résumé

A Madagascar, un programme de sélection sur les eucalyptus est conduit à l'aide de vergers à graines, en pollinisation libre qui constituent les populations d'amélioration. L'obtention de gains génétiques et le maintien de la diversité génétique sont réalisés si la reproduction tend vers le modèle panmictique. Or, le faible niveau de domestication des essences forestières et les conditions environnementales conduisent à une variabilité phénotypique importante ayant des conséquences probables sur la phénologie. Dans un premier temps, notre approche est basée sur la caractérisation biologique d'un verger de 349 *Eucalyptus grandis*. Ensuite, il s'agit d'effectuer, sur un échantillon de 724 descendants récoltés sur 30 géniteurs, une analyse de paternité basée sur 6 marqueurs microsatellites. Nous en déduisons les conséquences sur la variabilité génétique et la croissance des descendants.

En première approche, les résultats confirment les inquiétudes que nous avons quant à la panmixie et à l'équi-participation des géniteurs. Le taux de pollution pollinique atteint 39% et les contributions des géniteurs au nuage pollinique diffèrent de leur effectif dans le verger. En revanche, plus de 50% d'entre eux y ont participé et nous n'avons pas observé d'effet de voisinage sur la pollinisation. Le taux moyen d'allogamie est de 97% et les croisements entre demi-frères représentent 3,5% des recombinaisons. Seule la croissance des descendants issus d'autofécondation est significativement affectée par les effets de la dépression consanguine. En dépit du taux de contamination, nous pouvons estimer que le brassage génétique, confirmé par le maintien de la variabilité allélique et le faible taux d'autofécondation, correspond à ce qui est attendu sous l'hypothèse de la panmixie. Néanmoins, certaines recommandations sont proposées pour atteindre les objectifs multiples attribués aux vergers à graines et pour limiter la contamination pollinique.

Gene flow studies in an *Eucalyptus grandis* seed orchard in Madagascar

Abstract

In Madagascar, a genetic improvement programme was conducted for fast-growing eucalypts in open pollinated seed orchards, which constitute the breeding population. Long-term genetic gain and maintenance of genetic diversity will be achieved if reproduction is based on panmictic conditions. However, the typically low domestication of the forest species and the natural environmental conditions could lead to phenotypic variability, with likely consequences for tree phenology. Initially, our approach was based on the biological characterisation of 349 *Eucalyptus grandis*. We then analysed paternity with six microsatellite markers for 724 offspring sampled from 30 progenitors. We deduced the consequences for genetic variability and for growth of progeny.

In accordance with our premises, the results showed that panmictic conditions and equal contributions from progenitors could not be assumed. The pollen flow from outside the stand reached nearly 40% and the male parent contributions differed from those of the seed orchard. Over 50% of potential male parents contributed equally to the identified matings with no neighbour effect. The overall outcrossing rate was 97% and half-brother matings represented 3.5% of the recombination. Only inbred offspring growth was significantly affected by the consanguineous depression effects. In conclusion, despite the high contamination level, the genetic mixing, confirmed by maintenance of allelic variability, can be assumed to be "panmictic-like pollination". Nevertheless, several recommendations are proposed to achieve the various aims of seed orchards and to limit pollen contamination.

DISCIPLINE

Mots clés : *Eucalyptus grandis*, microsatellites, analyse de paternité, vergers à graines, Madagascar

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France