

CONVENTION MENRT / IRD (du 24/12/1998)

STRATÉGIES DE RECHERCHE ET DE VALORISATION INDUSTRIELLE DES  
SUBSTANCES NATURELLES ISSUES DE LA BIODIVERSITÉ TROPICALE

ETUDE D'UNE RESSOURCE A FORTE VALEUR AJOUTEE,  
LE BOIS DE ROSE DE GUYANE :  
- ANALYSE DES RESSOURCES GENETIQUES  
- CREATION DE PARCELLES CONSERVATOIRES

---

**Rapport final**

Juillet 2001



*Liberté • Égalité • Fraternité*  
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

PREFECTURE DE LA REGION GUYANE



Institut de recherche  
pour le développement

## PREAMBULE

### GENÈSE DU PROJET

Le projet présenté au SEOM<sup>1</sup> (Étude du bois de rose de Guyane : variabilité chimique de l'essence et diversité génétique) a été recentré sur la chimie des substances naturelles après expertise du MENRT<sup>2</sup>. Cette étude intègre le recensement des peuplements existants et leur caractérisation tant au plan chimique (variabilité des huiles), botanique (variabilité morphologique), que génétique (déterminisme génétique du caractère lévogyre ou dextrogyre des constituants de l'huile).

Cependant il s'est avéré que les questions concernant la conservation de l'espèce *Aniba rosaeodora* en tant que ressource menacée, et qui devaient être abordées dans le volet agronomique du projet initial présenté (études des possibilités de mise en culture), nécessitaient une approche particulière et des moyens importants non pris en compte dans le financement attribué par le SEOM.

C'est ainsi qu'un projet intitulé "Etudes sur le bois de rose (*Aniba rosaeodora*) : analyse des ressources génétiques, création de parcelles conservatoires" a été mis en œuvre en collaboration avec le CIRAD. Ce projet a bénéficié d'un financement du MENRT sur les reliquats de crédits du CRITT-Guyane<sup>3</sup>.

**L'étude du bois de rose guyanais comporte donc deux volets menés en parallèle et qui font l'objet de deux rapports séparés :**

- **Variabilité chimique de l'essence et diversité génétique<sup>4</sup> (convention IRD - SEOM)**
- **Analyse des ressources génétiques<sup>4</sup>, création de parcelles conservatoires (convention IRD / CIRAD - MENRT)**

<sup>1</sup> Secrétariat d'Etat à l'Outre-Mer

<sup>2</sup> Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie

<sup>3</sup> Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologie

<sup>4</sup> Le volet génétique réalisé par le CIRAD, commun aux deux projets, a été co-financé par le SEOM et le MENRT

## UNE CONTRIBUTION À LA VALORISATION DES SUBSTANCES NATURELLES DE LA FORÊT GUYANAISE

Ces deux volets de l'étude du bois de rose s'inscrivent dans une **démarche plus globale définissant une stratégie de recherche et de valorisation industrielle des substances issues de la biodiversité de la forêt guyanaise**, démarche présentée par l'IRD aux instances territoriales de Guyane.

De par la diversité biologique qu'elle renferme, la forêt guyanaise est un gisement encore peu exploré de ressources génétiques et de bio-molécules actives.

Ce constat avait conduit à la mise en place d'un « Pôle de valorisation des substances naturelles » par le CRITT-Guyane, en partenariat avec l'ORSTOM. La dissolution du CRITT en 1998, a interrompu cette initiative.

Les fonds attribués par la Préfecture pour la mise en œuvre de cette stratégie étaient destinés d'une part à l'acquisition des équipements de base nécessaires, d'autre part au financement de l'étude menée par le CIRAD précisée ci-dessus.

Le projet « Bois de rose » présenté s'inscrit donc dans ce contexte particulier : la nécessité d'une relance des projets sur les substances naturelles (demande croissante des entreprises), tout en tenant compte des « erreurs » du CRITT telles qu'elles ressortent de sa courte expérience.

Le projet, tout en constituant l'un des maillons d'une étude plus vaste sur les substances naturelles (projet d'Unité Mixte de Recherche CNRS / IRD / Groupe Fabre), s'est fixé un objectif avec des résultats évaluables à moyen terme : **étudier la variabilité chimique de l'essence de bois de rose, préalable indispensable à une relance éventuelle de la production durable du bois de rose de Guyane.**

## **RAPPORT FINAL**

### **Études sur le Bois de Rose (*Aniba rosaeodora*) :**

- **analyse des ressources génétiques**
- **création de parcelles conservatoires**

**Jean-Marc BOUVET  
Pierre DUBUS  
Laurent MAGGIA**

**CIRAD**

---

### **Sommaire**

- 1 – prospection des populations résiduelles
- 2 – mise au point des techniques sylvicoles
- 3 – analyse de la diversité génétique des populations résiduelles
- 4 – mise en place d'une parcelle conservatoire

## Introduction

Les travaux présentés dans le rapport s'inscrivent dans une problématique initiée par l'IRD et intitulée : **Valorisation industrielle des substances naturelles - Etude d'une ressource à forte valeur ajoutée : le Bois de Rose en Guyane** » dont le responsable est C. Moretti, Directeur de recherche à l'IRD.

Il avait été décidé entre le CIRAD et l'IRD, lors du Comité Technique de Programmation Recherche de 98 organisé par les autorités préfectorales, qu'une partie des fonds du Ministère de la Recherche recueillis par l'IRD pour ces études serait mise à la disposition du Cirad-Forêt pour réaliser des recherches concernant l'analyse des ressources génétiques à partir de marqueurs moléculaires et installer des plantations de type conservatoire se prêtant aux études de génétique quantitative.

Les travaux présentés dans le rapport ont été réalisés dans le cadre d'une convention entre l'IRD et le Cirad-Forêt, avec les objectifs suivants :

- Faire un premier bilan des sites d'échantillonnage du Bois de rose,
- Faire une analyse de la structuration de la diversité génétique par des marqueurs moléculaires et analyser plus finement l'éventuel complexe d'espèce associé,
- Mener une étude phénologique et mettre au point les itinéraires techniques pour la récolte de graines, leur conservation, leur germination, le semis et l'élevage des plants en pépinière,
- Commencer à mettre au point la sylviculture de l'espèce en vue de plantation à plus grande échelle que des parcelles conservatoires,
- Initier la mise place de parcelles conservatoires sous forme de descendances séparées pour la sauvegarde de matériel végétal et des parcelles destinées à des études de génétique (effet génétique/effet du milieu) concernant la variabilité phyto-chimique des huiles essentielles en fonction des stades de développement, des parties de la plante.

## 1 – Prospection des populations résiduelles

Ces travaux ont été réalisés par l'ONF et par le Cirad-Forêt

Plusieurs sources d'informations ont permis de réaliser des prospections de Bois de Rose pour répondre à la demande de l'IRD et du CIRAD-Forêt :

↳ **Inventaire à 5%** : au début des années 1990, l'ONF réalisait des inventaires à 5% dans les parcelles proposées à la vente, des Bois de rose avaient été repérés à cette occasion dans une vingtaine de parcelles.

La majorité de ces parcelles ont depuis été exploitées, il est alors impossible de retrouver les arbres repérés lors des inventaires.

Dans les parcelles non exploitées, des vérifications ont été effectuées, certains arbres identifiés comme Bois de rose, étaient en fait des « Bamba apici » ou « Mâle rose », ces erreurs sont dues à une mauvaise connaissance de l'espèce par les prospecteurs.

Seuls 2 arbres ont pu être retrouvés et certifiés comme Bois de rose dans les parcelles 10 et 11 de la forêt de Yiyi.

↳ **Inventaire au 1/1 000<sup>ième</sup>** : une grande campagne d'inventaire a été réalisée par l'ONF au début des années 1970 (un layon Nord-Sud tous les 10 kilomètres) sur toute la bande côtière de la Guyane, malheureusement seules les essences commerciales étaient identifiées avec précision, donc les listes d'inventaire n'apportent pas de renseignements intéressants concernant la présence éventuelle de Bois de rose.

Mais de mémoire d'un agent encadrant une équipe de prospecteurs de l'époque, il y aurait eu un peuplement important de Bois de rose le long du layon traversant le versant nord de la Montagne Plomb (le layon n'existe plus, bien entendu, depuis de nombreuses années).

L'accès à cette zone est rendu difficile depuis la mise en eau du barrage EDF de Petit Saut qui oblige un détour de 10 kilomètres environ praticable uniquement à pied.  
Un seul arbre retrouvé et certifié comme Bois de rose.

↳ **Diagnostics et inventaires en cours** : afin de mieux connaître la ressource des forêts aménagées, l'ONF réalise depuis 1998 des diagnostics et des inventaires d'exploitation des parcelles proposées à la vente.

D'autre part, des placettes de suivi permanent ont été installées en forêt pilote de Risquetout où sont expérimentées des méthodes de sylviculture.

Quelques Bois de rose ont été repérés au cours de ces diagnostics et inventaires : CBO Macouria, Parcelle 14 Risquetout, Parcelle 15 Tibourou, Parcelle 23 Grillon.

↳ **Informateurs** :

- Mémoire locale : il s'agit en général de petites plantations réalisées par les exploitants de Bois de rose lors de la première moitié du XX<sup>e</sup> siècle, le long des fleuves : Orapu, Comté, Lysis, Approuague.
- Mission scientifique CNRS - Muséum d'histoire naturelle : des contacts ont été liés avec ces différents organismes qui nous informent de leurs trouvailles éventuelles : Saül, Ouanary.

À ce jour, dix différents sites, répartis dans les 200 km de profondeur de la bande côtière comprise entre Ouanary à l'Est et Iracoubo à l'Ouest, ont pu être identifiés grâce à diverses prospections menées sur le terrain. Ils ont toutes fait l'objet de récoltes en matériel biologique. Ces sites comprennent soit des individus isolés, soit des populations pouvant atteindre une soixantaine d'individus. Ces populations peuvent être le fruit soit de la régénération naturelle, soit de l'action de l'homme (parcelles dans lesquelles ont été semées en vrac des graines récoltées aux environs par des particuliers). Les populations les plus importantes en nombre, recensées à ce jour, sont issues de ce type de plantation.

Chaque site prospecté fait l'objet d'une fiche descriptive incluant un plan d'accès et de positionnement des plants qui y ont été observés. De même, chaque récolte opérée fait également l'objet d'une fiche spécifique l'identifiant.

## 2 - Etudes sylvicoles

Parallèlement aux études portant sur la composition de l'huile essentielle extraite du « Bois de Rose » d'une part, sur sa caractérisation génétique d'autre part, quelques aspects de la sylviculture de cette espèce ont aussi été abordés.

Ces travaux comportent 3 parties :

1 : des études préliminaires ;

Des informations ont été recueillies dans le cadre d'une étude bibliographique effectuée à l'occasion de la rédaction d'un mémoire de DESS (Ibrahim Linjouom : conservation des ressources génétiques, plan d'action pour la sauvegarde d'une espèce en voie de disparition, le bois de rose, *Aniba rosaeodora* Ducke). Quelques renseignements sur les pratiques sylvicoles utilisées au Brésil ont été obtenus auprès de l'INPA et de l'EMBRAPA de Manaus à l'occasion d'une mission sur place.

2 : des activités en pépinière ;

Des récoltes de graines ou de sauvageons (jeunes plants issus de semis naturel) ont été effectuées dans 5 petits peuplements reconnus au cours des prospections. Ce matériel a

été utilisé pour produire environ 1000 plants en pépinière. Des expérimentations ont permis d'améliorer sensiblement le taux de germination des semences.

3 : la mise en place d'une première parcelle expérimentale ;

Une petite parcelle (162 plants), dans laquelle le niveau d'ombrage est variable, a été installée en mai 2000, afin d'observer le comportement de l'espèce en fonction de la luminosité.

La mise en place d'une parcelle conservatoire (480 plants, en décembre 2000) fait intervenir d'autres préoccupations. Ces aspects sont traités par ailleurs.

## 2.1 - Les études préliminaires.

L'état des connaissances sur la botanique, la biologie, la distribution et la phénologie de la ressource "bois de rose" est exposé en détail dans le rapport *Étude du bois de rose de Guyane : variabilité chimique de l'essence et diversité génétique*.

### Taxonomie.

Les différentes publications consultées à ce sujet laissent subsister quelques doutes sur la détermination exacte des « Bois de Rose ».

Deux certitudes ont été retenues :

- ces arbres font incontestablement partie du genre *Aniba*, (famille des *Lauraceae*).
- l'huile extraite de l'espèce *A. rosaedora* contient une forte proportion de linalol, élément principal de l'essence de « Bois de Rose ».

Néanmoins il est possible que d'autres espèces d'*Aniba* produisent cette molécule. Par ailleurs la variabilité d'*Aniba rosaedora* conduit certains botanistes à distinguer plusieurs espèces à l'intérieur de ce taxon.

Dans le contexte de la présente étude, l'appellation « Bois de rose » correspond à quelques caractères morphologiques évidents (forme de la feuille, courbure du pétiole) et sur la présence de linalol, dont l'odeur forte et particulière est dégagée par tous les organes de la plante, à tous les âges (bois de tronc, de branches, de rameaux, feuilles, fruits etc..).

### Distribution et phénologie de l'espèce.

Les « Bois de Rose » se rencontrent dans la partie Centre et Nord du bassin amazonien, du Venezuela au Brésil (appellation locale : « Pau rosa »), à l'état semi grégaire ou à l'état isolé. Il est possible que l'état isolé soit le résultat d'une surexploitation locale.

La floraison et la fructification de l'espèce est irrégulière. Elle interviendrait en moyenne une année sur 2.

Les fruits sont souvent consommés sur l'arbre par des perruches. Ils sont presque systématiquement parasités par une larve de Coléoptère (*Curculio* sp). Aussi les services forestiers brésiliens éprouvent des difficultés à s'approvisionner en semences viables.

### Comportement en plantation.

La principale préoccupation des sylviculteurs a été de définir les meilleures conditions d'installation d'un peuplement de cette espèce. S'il semble qu'une mise en place sous couvert forestier paraisse plus naturelle, quelques publications préconisent une implantation en plein découvert. Dans tous les cas les résultats chiffrés sont insuffisamment détaillés pour définir un procédé.

Par ailleurs quelques peuplements âgés ont été observés. Il s'agit :

- d'une plantation dans le Parc de Duke près de Manaus (35 ans, sous couvert forestier éclairé à 70% ; les faibles diamètres individuels – 20 cm dans les meilleurs des cas – peuvent être imputés à la pauvreté des sols).
- de 5 peuplements de 3 à quelques dizaines d'arbres dans l'est de la Guyane. Mis en place à l'initiative de planteurs privés, les informations sur les conditions d'installation de ces peuplements ne sont pas fiables. Les diamètres de quelques sujets (50 ans ou

plus) dépassent 60 cm pour des hauteurs de plus de 20 mètres. Ces peuplements sont souvent mélangés à d'autres essences. La régénération naturelle est forte. De jeunes rejets ont pu être observés sur des arbres dont la cime était morte.

### **Intérêt des plantations.**

Les estimations de la production d'une plantation de Bois de Rose sont très variables : 1 à 10 m<sup>3</sup>/ (ha x an). Les méthodes d'évaluation n'ont pas été précisées. Il paraît prudent de retenir le premier chiffre.

Le volume d'essence de bois de rose officiellement commercialisé, en augmentation ces dernières années, reste inférieur à 100 tonnes/ an. Il provient essentiellement de peuplements naturels au Brésil.

La tendance de la production est à la baisse alors que la demande pour les formulations haut de gamme reste stable (CF. rapport *Étude du bois de rose de Guyane : variabilité chimique de l'essence et diversité génétique*), il devient alors nécessaire de promouvoir la sylviculture de cette espèce.

Les services forestiers brésiliens accordent une grande importance à la sylviculture de cette espèce. Ils considèrent qu'une part importante de la production n'est pas déclarée. Par ailleurs, dans le cadre d'une réglementation imposée par l'IBAMA, l'agence brésilienne chargée de la protection de l'environnement, les exploitants sont tenus de renouveler la ressource utilisée par des plantations ; cette réglementation n'est pas convenablement appliquée faute de ressource en matériel végétal. Un projet « Pau Rosa » est en cours pour résoudre ce problème.

### **Conséquences de ces études préliminaires.**

Des informations imprécises voire contradictoires, et des perspectives incertaines concernant le développement de plantations de « Bois de Rose » ont conduit à adopter l'attitude suivante :

- il est considéré que la préoccupation principale d'un programme sur le « bois de rose » en Guyane relève de la sauvegarde de l'espèce. Au niveau de la sylviculture, l'objectif est d'installer une parcelle conservatoire « ex situ » rassemblant les descendants d'individus d'origine aussi variés que possible, pour lesquels les ressources en matériel végétal sont faibles. La fiabilité au niveau de la production de plants à partir de semences et au niveau de l'installation en parcelle est ainsi un élément déterminant.
- les préoccupations des services forestiers brésiliens sont à prendre en compte afin de développer d'éventuelles collaborations. Dans ce cadre l'optimisation des méthodes de propagation prend de l'importance.
- le comportement de l'espèce en peuplement artificiel est mal connu. Les expérimentations envisagées doivent rester élémentaires.

## **2.2 - Les activités en pépinière.**

Une note produite en janvier 2000 récapitulait l'ensemble des résultats obtenus en pépinière. Les principaux éléments sont les suivants :

### **Méthode de semis :**

- en germoirs, sur 6 cm de substrat (5/6 de sable grossier de rivière, 1/6 de terre forestière stérilisée par chauffage). La surface est façonnée en billon de 2 cm de hauteur sur 5 à 6 cm de large. Les graines sont placées à environ 0.5 cm de la crête du billon pour éviter les risques d'asphyxie. Densité de semis : environ 400 graines au m<sup>2</sup>.
- arrosage au goutte-à-goutte – a raison de 10 mm/jour. Le fond du germoir est ajouré pour assurer un bon drainage de l'eau en excédent.
- traitement antifongique en cas d'apparition de filaments mycéliens (Rovral, benlate) ou de dépérissement des feuilles.
- Ombrage par des feuilles de polyester translucide.



### **Taux de germination :**

Sans traitement particulier, il est d'environ 30% à 5 semaines.

Ce taux variait significativement selon les différentes récoltes. Cependant il n'a pas été possible de déterminer les facteurs qui avaient une influence sur les résultats.

La levée survient généralement entre 4 et 8 semaines après le semis. Cependant des levées très tardives ont pu être observées (6 mois, voire 1 an après le semis). Ainsi le taux de levée constaté sur l'ensemble de la campagne atteint 40%.

Aucune méthode de conservation des graines n'a été testée. Celles-ci ne semblent pas pâtir d'un séjour à l'air libre, en abris aérés, sans autre précaution particulière, d'une à deux semaines.

Selon des informations recueillies au Brésil, les semences de bois de rose ne supporteraient pas les séjours en chambre froide.

### **Traitements des semences.**

À l'issue d'une expérience, il paraît possible de proposer un traitement des semences consistant ;

- à dépulper les fruits principalement pour constater le niveau des attaques par les larves de Curculions . (79% des semences étaient manifestement attaquées. Il est probable de plus qu'une partie des semences apparemment saines soient parasitées) ;
- à trier les graines selon le niveau de l'attaque ;
- à injecter du decis à la seringue (environ 0.1 cm<sup>3</sup> / graine à la concentration de 10 mg/litre) dans la galerie creusée par la larve quand elle est visible. Les graines peu attaquées (injection difficile) et les graines fortement attaquées (effet défavorable probable du decis sur l'embryon) ne sont pas traitées.

Le taux de germination d'un lot traité selon cette méthode était de 35 % à 5 semaines, significativement différent d'un taux de 29% relevé sur un lot non traité.

### **Repiquage et élevage.**

Les plants issus des semis ont été repiqués au stade 2 à 4 feuilles (hauteur de 5 à 10 cm) en sachet de polyéthylène de 1 litre (20 cm de haut) rempli d'un mélange de 3/4 de terre forestière et d'1/4 de sable.

À ce stade, les plants ont été placés dans des bassins bétonnés, sous abris aérés (feuille de polyester translucide) remplis d'eau (lame de 5 à 7 cm) deux fois par semaines, pendant quelques heures, pour assurer un arrosage par capillarité.

Quelques attaques d'insectes ont été relevées (Curculion adulte et Cochenille principalement, traitées respectivement au Decis – pyrétrénoïde de synthèse - et à l'ultracide – méthidathion – selon les indications des fabricants).

Quelques dépérissements liés à une asphyxie probablement associée à une attaque fongique sont apparus sur les plants ayant séjourné longtemps en pépinière. Ils semblent être corrigés par un rempotage dans un milieu plus drainant (1/2 terre forestière, 1/2 sable) ou par un traitement au benlate. Ces incidents sont provoqués paradoxalement par l'activité des lombrics qui modifie la cohésion du substrat.

Le taux de mortalité des plants repiqués est quasi nul à 6 mois.

Le mode d'élevage utilisé actuellement paraît satisfaisant.

### **Conclusion sur la production en pépinière.**

La production de plant de Bois de rose en pépinière ne pose pas de grosses difficultés : il s'agit d'une espèce assez robuste.

Cependant, les précautions à prendre, d'après le comportement des premiers sauvages rempotés en pépinière, sont :

- d'éviter un séjour dans un milieu confiné (comme les serres tunnel).

- d'éviter l'arrosage des feuilles.

La production de plants de bois rose par semis en pépinière est principalement limitée par l'irrégularité de la ressource en semence et par leur mauvais état sanitaire.

### **2.3 - Expérimentation sur le comportement en plantation selon différents niveaux d'ombrage**

#### **Les plants.**

En mai 2000, la hauteur des plants les plus précoces permettait d'envisager la plantation d'une petite parcelle afin d'observer leur comportement au champ.

L'effectif (162 plants dont la hauteur était comprise entre 12 et 22 cm) n'était toutefois pas suffisant pour installer un dispositif de comparaison robuste : l'objectif de l'opération est essentiellement de recueillir les premières données pour ajuster les campagnes de plantation ultérieures.

9 lots homogènes de 18 plants chacun ont été constitués.

#### **Le site et les facteurs de variation.**

Un site de la station de Paracou a été aménagé pour disposer de 9 parcelles correspondant à 3 niveaux d'ombrages distincts :

- trois parcelles (3 rangs de 6 plants à l'écartement de 3x3 m<sup>2</sup>) sont en plein découvert, sur pelouse naturelle.
- trois parcelles (3 rangs de 6 plants à l'écartement de 3x3 m<sup>2</sup>) sont situées à l'intérieur d'un peuplement d'Acacia mangium âgés de 8 ans (plantation de 1992). La densité de ce peuplement est d'environ 500 tiges /hectares (pour une densité initiale de 1111 plants)
- trois parcelles (2 rangs de 9 plants à l'écartement de 3x3 m<sup>2</sup>) sont installées sous une formation naturelle secondaire dans laquelle les tiges de moins de 10 cm de diamètre ont été éliminées. Ce milieu correspond approximativement à celui sous lequel une régénération naturelle abondante a été constatée.

Une mesure du rayonnement solaire, à l'aide de papiers photosensibles, a montré que les 3 parcelles d'un même milieu étaient comparables et que les 3 milieux étaient nettement différents.

Les 3 parcelles d'un même milieu se distinguent par leur position topographique : sommet de pente, milieu de pente et bas de pente. Cependant il ne semble pas que l'emplacement de la parcelle puisse être facilement relié à la nature du sol (sol ferralitique, à drainage latéral).

#### **Installation et entretien.**

L'installation des plants a été effectuée en grands potets (trouaison de 0.50 m en tous sens). L'apport d'engrais à la plantation a été volontairement limité – 50 grammes de NPK 17 – 17 – 17 pour limiter le développement des adventices.

Un entretien régulier est effectué pour rabattre la végétation herbacée sur l'ensemble des parcelles et empêcher le développement de toute adventice dans un rayon de 0.50 autour de chaque pied : un tel niveau d'entretien n'est vraisemblablement pas envisageable sur de grandes parcelles.

#### **Premières observations.**

Une mesure et une description des arbres effectuées en Août 2000 (3 mois) a montré :

- un taux de survie convenable (1 plant mort)

- un accroissement faible : 2 cm
- de très faibles différences entre les milieux sur les comparaisons de données mesurées.

En faisant intervenir des éléments plus descriptifs, il semblait que les arbres sous formation naturelle paraissaient plus sains (couleur des feuilles).

Ultérieurement (visite de parcelle au premier et second trimestre 2001), le taux de survie a diminué (93%). La différenciation selon les milieux semble plus nette avec :

- une forte hétérogénéité dans le milieu ouvert, où se trouvent les plus grands individus (45 cm de haut) et une grande homogénéité dans le milieu sous formation naturelle.
- un aspect plus sain des plants (feuilles vert foncé et absence de lésion) dans le milieu sous formation naturelle.

Par ailleurs la corrélation entre les dimensions d'un plant en parcelle et ses dimensions à la sortie de pépinière s'estompe.

Une campagne de mesures et d'observations doit intervenir pour préciser ces remarques.

### **La parcelle de l'ONF (Matiti)**

L'ONF a par ailleurs installé une autre petite parcelle expérimentale sur un ancien abattis recolonisé par des essences naturelles dans lequel les différences entre niveaux d'ombrage sont moins contrastées et relativement faibles.

Les meilleurs plants de cette parcelle sont incontestablement plus grands et plus vigoureux que les meilleurs plants de Paracou. Il est cependant difficile d'en déterminer les raisons compte tenu des nombreux facteurs différents entre les plantations de l'ONF et celles du Cirad.

### ***Premières conclusions sur les essais de plantation.***

La robustesse des Bois de rose à l'état juvénile est confirmée (faible taux de mortalité).

Les facteurs qui influencent leur croissance ne sont pas clairement cernés.

Il apparaît qu'aux premiers stades, un jeune semis soit capable d'attendre des circonstances favorables à son développement sans accroissement notable (comportement des plants sous formation naturelle de Paracou).

Il semble que la lumière soit un facteur favorable, même si ses effets ne sont pas tous bénéfiques.

Ces observations ont été utilisées pour l'installation de la première parcelle conservatoire (décembre 2000) en forêt naturelle avec une forte intensité d'éclairement.

Malgré un bon démarrage des plantations, les connaissances sur la sylviculture de l'espèce restent très rudimentaires : une poursuite des travaux s'impose.

### **3 – Analyse de la structuration de la diversité génétique des populations résiduelles**

Le financement MRT a permis l'achat d'un thermocycleur et donc facilité le développement de méthodes de marquage moléculaire.

Deux principales méthodes utilisées avec l'échantillonnage du bois de rose sont présentées ci-dessous dans le paragraphe matériel et méthodes.

Les premiers résultats relatifs à la structuration de la diversité génétique sur marqueurs moléculaires neutres sont présentés par la suite.

#### **3.1 - MATERIELS ET METHODES**

##### ***L'échantillonnage***

Le matériel végétal ciblé, jeunes feuilles, est directement prélevé sur l'arbre échantillonné à l'occasion de prospections menées sur le terrain.

C'est ainsi qu'à partir des un peu plus de 200 individus repérés sur le terrain et répartis sur une dizaine de sites, 79 échantillons représentatifs de l'ensemble ont été récoltés en vue de les caractériser par approche moléculaire.

##### ***La conservation des feuilles récoltées***

L'étiquetage des échantillons récoltés permet de se référer au prospecteur, à la date de récolte, au site prospecté, à l'emplacement de l'arbre sur le site, et au diamètre de l'arbre.

Une fois étiquetés, les sachets de feuilles d'un même site sont réunis dans un seul sachet référencé. Ces échantillons frais ont été conservés dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  à Kourou.

##### ***Extraction de l'ADN***

Pour chaque échantillon récolté, l'ADN est extrait à partir de 200 mg de feuille préalablement coupée et mise dans un mortier contenant 2 ml de tampon d'extraction (CTAB 2x).

Le matériel est broyé dans le mortier, sous azote liquide, puis transféré dans un micro-tube de 2 ml et 1400  $\mu\text{l}$  de tampon d'extraction y sont additionnés.

La solution est ensuite mise à incuber pendant 30 minutes à  $65^{\circ}\text{C}$  sous agitation.

La déprotéinisation se fait par addition dans le micro-tube de 600  $\mu\text{l}$  de dichlorométhane:chloroforme:octanol (25 :24 :1) et homogénéisation par agitation douce.

L'ADN est isolé, après 15 minutes de centrifugation à 13000 tr/min à  $20^{\circ}\text{C}$ , dans le surnageant qui est transféré dans un micro-tube de 2 ml.

L'ADN est ensuite précipité en additionnant dans ce tube  $1/10^{\text{ème}}$  du volume contenu en acétate de sodium à 3M complété à 2ml avec d'isopropanol froid.

Afin de permettre une précipitation optimale, la solution est homogénéisée et les tubes sont laissés une heure à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

L'ADN est alors culotté par centrifugation à 6000 tr/min entre 0 et  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes.

La phase liquide est éliminée et l'ADN est rincé dans 1 ml d'éthanol à 75% par agitation ménagée à température ambiante.

Une dernière centrifugation est effectuée à 13000 tr/min entre 0 et  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes, puis la phase liquide est à nouveau éliminée.

Enfin, le culot d'ADN est mis à sécher à l'évaporateur pendant 10 minutes, puis resuspendu dans une solution de 200  $\mu\text{l}$  de TE (10mM de Tris HCl + 0.1mM d'EDTA).

Cette solution d'ADN constitue la solution mère d'ADN, elle est conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Contrôle qualité, dosage et dilution de l'ADN extrait**

La qualité des ADN ainsi extraits, état de dégradation, est contrôlée par migration d'un aliquote (5 µl) de chaque extrait dans un gel d'agarose à 1,8% et visualisation sous UV après coloration au bromure d'éthydiu (BET). Les ADN jugés dégradés sont éliminés et une autre extraction est faite à partir des échantillons concernés.

Le dosage des solutions mères d'ADN s'effectue au fluorimètre TD-700 (Bioblock Scientific) suivant le protocole à la coloration d'Hoescht préconisé par le fabricant.

Une fois dosées, les solutions mères d'ADN sont diluées avec de l'eau distillée stérilisée afin d'obtenir des solutions filles à une concentration de 2 ng d'ADN/µl. Ces solutions filles sont conservées à -20°C.

### **RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ou amplification aléatoire d'ADN polymorphique)**

Un travail initial a consisté à tester sur quelques individus une soixantaine d'amorces RAPD du commerce, les lots Opérons W, X, et Y. Après migration sur gel d'agarose et révélation au BET, les profils de bandes les plus diversifiés ont été retenus pour l'étude de l'ensemble des échantillons récoltés. Ce qui a réduit à 9 le nombre amorces à utiliser (OPW2, OPW5, OPX2, OPX3, OPY7, OPY13, OPY15, OPY17, et OPY18).

La technique RAPD utilisée suit le protocole expérimental décrit ci-dessous.

Pour 20 µl de solution de réaction finale, et par échantillon, 2,4 ng d'ADN, 0,25 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM d'amorce, du tampon d'enzyme à concurrence d'une concentration finale de 1x, 1 U de Taq polymérase (Gibco BRL) sont mixés dans un même micro-tube PCR de 200 µl.

L'amplification d'ADN est effectuée grâce au thermo-cycleur « Perkin Elmer / GeneAmp 9600 » selon la succession des différents cycles suivants :

- 1 minute de dénaturation à 94°C,
- suivie de 20 cycles comprenant (1 étape à 94°C de 30 secondes de dénaturation, puis 1 étape d'appariement à 37°C de 50 secondes réduites d'une seconde après chaque cycle, enfin 1 étape de synthèse à 72°C durant 1 minute),
- puis 15 cycles de (93°C\_30'' ; 37°C\_30'' ; 72°C\_1'),
- et 15 cycles de (93°C\_30'' ; 37°C\_30'' ; 72°C\_1' étendue de supplémentaires 5''/cycle),
- enfin 1 dernière étape de 2 minutes à 72°C.

Les fragments d'ADN obtenus sont séparés selon leur poids moléculaire par migration dans un gel d'agarose à 1,8% en présence de TBE 0.5X, puis révélés au BET et visualisés sous UV.

Une analyse factorielle par correspondance est menée sur l'ensemble des échantillons ; ceci après construction d'un tableau, récapitulant la présence, notée 1, ou de l'absence, notée 0, de chaque bande lue sur les différents profils RAPD obtenus.

L'analyse est conduite à partir du logiciel XLSTATS version 4.3 (Dr. T. FAHMY, 1999, <http://www.xlstat.com/contact.html>).

A partir de la présence ou de l'absence de chaque bande RAPD l'analyse de variance moléculaire a été également réalisée pour tester la non nullité de la variance génétique entre les populations (Logiciel WINAMOVA).

### 3.2 - RESULTATS

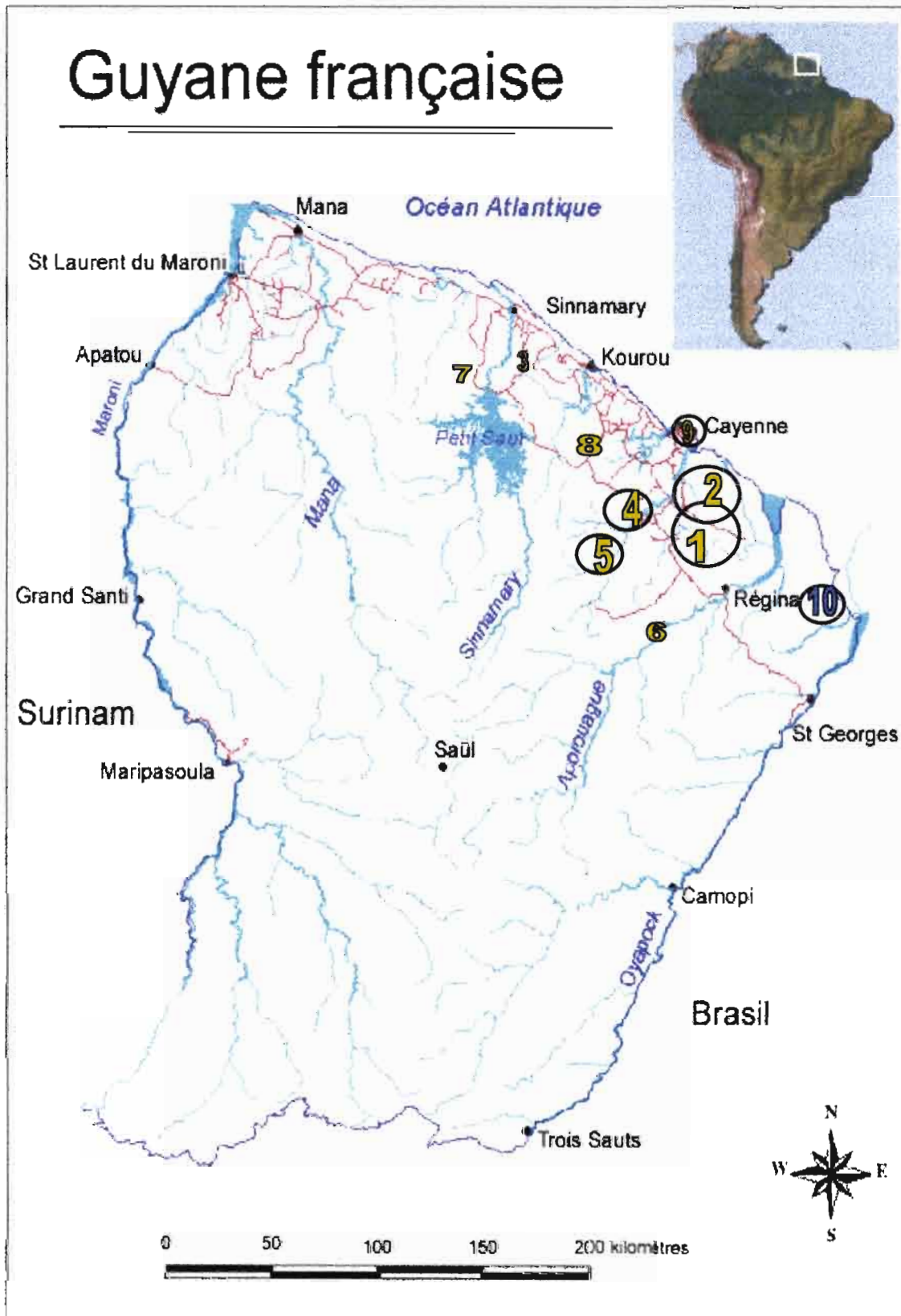
#### Échantillonnage

Le tableau ci-dessous présente les différents sites en bois de rose échantillonnés ainsi que leur typage RAPD (voir également la carte des relevés correspondants, page suivante). Ces résultats sont exposés et discutés plus bas.

Site	Lieu	Plantation	Nombre d'individus récoltés (79)	Typage RAPD
<b>1</b>	Agélas	oui	18	$\alpha$
<b>2</b>	Village d'Eskol	oui	17	$\alpha$
<b>3</b>	Site expérimental de Paracou		4	$\alpha$
<b>4</b>	Cacao	oui	9	$\alpha$
<b>5</b>	Lysis	oui	9	$\alpha$
<b>6</b>	Descendances Approuague	?*	1	$\alpha$
<b>7</b>	Forêt de YiYi		2	$\alpha$
<b>8</b>	Forêt de Risquetout		3	$\alpha$
<b>9</b>	Parc ONF de Cayenne	oui	5	$\alpha$
<b>10</b>	Ouanary	oui	11	$\beta$

Liste des différents sites en bois de rose échantillonnés

# Guyane française



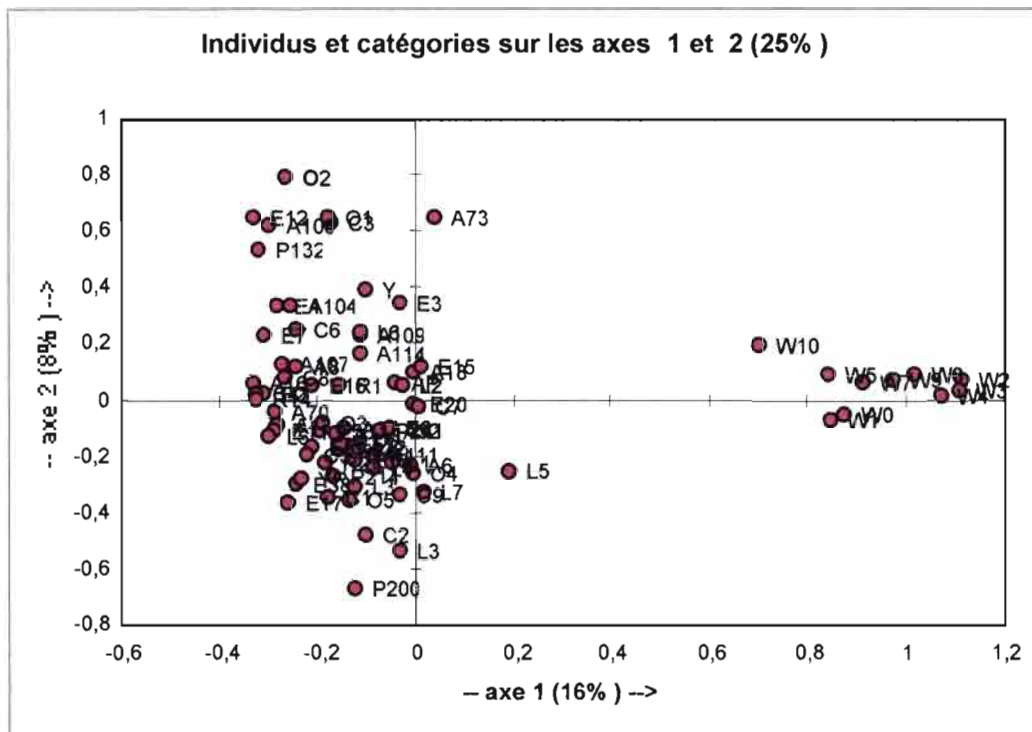
## Carte des relevés de Bois de rose en Guyane

- La taille des cercles représentant les populations est proportionnelle à la taille de l'effectif échantillonné sur le terrain
- La couleur du chiffre numérotant la population représentée est caractéristique de son empreinte génétique



## Résultats obtenus avec les marqueurs RAPD

L'analyse des correspondances multiples à partir des profils RAPD obtenus permet de mettre en évidence une discontinuité dans les pools de gènes partagés entre les différents sites en bois de rose étudiés. En effet, si une cohérence relative apparaît au niveau des populations de l'Ouest, Ouanary, seule population isolée à l'extrême Est de l'aire étudiée, se singularise nettement des autres (fig. ci-dessous). Ceci peut être s'expliquer soit par son isolement géographique, soit de par des origines particulières.



- Cette projection exprime 25% de la variabilité totale
- Les individus notés W sont issus de la population de Ouanary, les autres sont notés O pour ONF Cayenne, E pour Eskol, A pour Agélas, Y pour Yiyi, C pour Cacao, L pour Lysis, P pour Paracou, R pour Risquetout, et AP pour Approuague.

Conjointement à cette première analyse, une analyse des variances a été conduite à partir des cinq populations comportant un nombre suffisant d'individus afin de répondre aux exigences du modèle, soient les plantations d'Eskol, Agélas, Cacao, Lysis et Ouanary.

Cette analyse a permis de mettre en évidence que la variabilité s'exprimait plus à l'intérieur des populations qu'entre elles : [Variance inter-populations = 29.15%] < [Variance intra-population = 70.85%].

Cependant, des différences notables apparaissent entre les plantations étudiées et il est possible d'établir un degré similarité, ou diversité, entre les elles à partir du tableau des distances décrits ci-dessous (tab. 1).



**Tab. 1 : Distances relatives établies entre les 5 populations étudiées**

	Eskol	Agélas	Cacao	Lysis	Ouanary
Eskol	0.0000				
Agélas	0.0784	0.0000			
Cacao	0.1004	0.1110	0.0000		
Lysis	0.1694	0.1737	0.1029	0.0000	
Ouanary	0.4971	0.4865	0.4882	0.4914	0.0000

De ce tableau, il apparaît que les plantations d'Eskol, Agélas, et Cacao sont *quasi* équidistantes alors que celles de Lysis et surtout Ouanary se distinguent plus fortement. Ceci malgré, au moins pour Lysis, une proximité géographique.

Ce résultat est confirmé en testant les distributions des bandes RAPD pour chaque plantation à celle d'une distribution aléatoire de ces bandes avec un seuil de rejet à 0,4%.

## CONCLUSION

La ressource génétique du bois de rose de Guyane, en l'état actuel des connaissances, se résume plus à travers celle de plantations que de celle de populations naturelles. Ce qui s'explique par la large exploitation faite dans le passé.

Du fait de l'échantillonnage qui a pu être opéré dans notre étude, six des dix sites prospectés sont des plantations et à peine 5% de la ressource en arbres se trouve en milieu naturel. Les résultats présentés ici sont donc fortement influencés par la structuration artificielle des populations. L'absence de connaissance sur l'origine des plantations et les modalités qui ont servi à leurs constitutions, impossibilité de retracer la provenance géographique et l'ascendance parentale pour chaque individu repéré sur le terrain, ainsi que d'évaluer même le nombre de reproducteurs impliqués à leur genèse, est un fort handicap à une interprétation fine des résultats obtenus.

C'est pourquoi, il conviendra simplement :

- de constater une faible présence de l'espèce en milieu naturel, avec absence apparente de population dense,
- d'admettre des différences, plus ou moins prononcées, en termes de pool de gènes partagés entre des populations du Nord ouest celle de Ouanary au nord Est.

## 4 – Mise en place d'une parcelle conservatoire

### 4.1 - mise en place

Une parcelle conservatoire est une plantation ayant pour but de sauvegarder le maximum de diversité génétique après échantillonnage de la population d'origine.

Dans le cas du bois de rose, il a été décidé de constituer une parcelle conservatoire avec le maximum d'origines récoltées lors de la fructification 1999/2000 en s'appuyant sur les premiers résultats des techniques de plantation en Guyane et des expérimentations au Brésil observées lors de la tournée en juin 1999.

Il en en effet été décidé de réaliser cette plantation sous un peuplement préalablement éclairci par la coupe de toutes les tiges ligneuses dont le diamètre était inférieur à 20 cm.

La plantation a été réalisée avec des plants élevés en pépinière dans des tubes avec un substrat constitué de sols forestier. Avant plantation, une fertilisation de 50 grammes d'engrais complet a été apportée au fonds de chaque trou de plantation.

## 4.2 – Premières évaluations de la diversité phénotypique

Deux séries de mesure ont été réalisées ;

- une première juste après à la plantation en janvier 2001 : la mesure de la hauteur totale des plants a été mesurée.
- une seconde en avril 2001 ; les mesures ont porté sur la hauteur totale des plants, l'état sanitaire, la longueur et la largeur des feuilles, le nombre de pousses secondaires.

Le tableau 4.1 ci-dessous donne un aperçu des mesures effectuées sur les 480 individus.

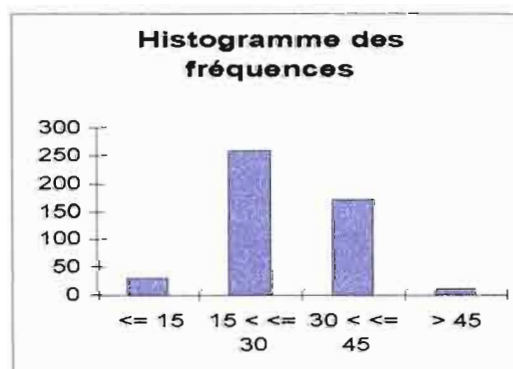
Bande	ligne	individu	site	Hauteur (en cm)	largeur feuille (en cm)	longueur feuille (en cm)	Attaque cochenille (oui/non)	nombre de ramifications (sauf destruction)	Pousses en cours de développement (oui/non)		
1	1	1	Eskcc	47.1	10.7	9	32.5	29.5	O	0	n
1	1	2	Eskcc	36.5	10	10	21.5	24.5	N	0	n
1	1	3	Eskcc	15	7	5	21.5	17	O	0	o
1	1	4	Eskcc	34	8	6.5	21	16	O	0	o
1	1	5	Eskcc	28.5	10.8	8.7	26	16	O	0	n
1	1	6	Eskcc	25.5	7.8	6.2	24.5	19	O	0	o
1	1	7	Eskcc	33.5	6.5	7.3	18	15.5	O	0	n
1	1	8	Eskcc	26.1	6.5	6.5	15.5	16.5	O	0	n
1	1	9	Eskcc	27	7.5	7.5	15.5	19.5	O	0	n
.....											
.....											

Les statistiques de base montrent, malgré le très jeune âge de la plantation, une variabilité phénotypique assez marquée sur les caractères quantitatifs. En effet, les coefficients de variation sur la hauteur et la taille des feuilles avoisinent les 30 %.

Les histogrammes ci-dessous illustrent la distribution pour les caractères quantitatifs.

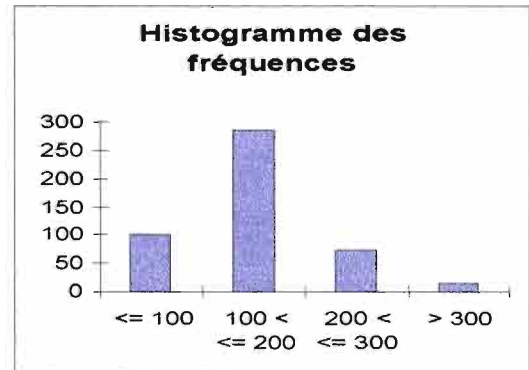
### Hauteur à 4 mois

Classe	Fréquence	Proportion
<= 15 cm	31	0.06540084
15 < <= 30	260	0.54852321
30 < <= 45	172	0.3628692
> 45 cm	11	0.02320675



## Surface foliaire

Classe	Fréquence	Proportion
<= 100 cm_	102	0.21518987
100 < <= 200	285	0.60126582
200 < <= 300	73	0.15400844
> 300 cm_	14	0.02953586



### 4.3 - Méthodologie de conservation

La parcelle conservatoire comporte aujourd'hui 480 individus sur un hectare. À terme, cette parcelle devra comporter un nombre d'individus compatible avec l'écologie de l'espèce permettant une fructification abondante, notamment si la parcelle doit faire office de parcelle productrice de graines.

Une densité de 100 arbres à l'hectare en fin de rotation est envisageable pour atteindre cet objectif. En effet à cette densité, chaque individu bénéficie en moyenne de 100 m<sup>2</sup> pour développer son houppier, ce qui paraît suffisant.

Sur le plan de la conservation, la finalité du choix des individus consiste donc à garder une centaine d'individus représentatifs de la diversité génétique des individus installés à la plantation.

Les analyses réalisées à partir des marqueurs moléculaires montrent aussi que les parents de ces 480 individus sont représentatifs d'une population du nord de la Guyane concernée par le même pool de gènes.

Il s'agit en fait de constituer une « core collection » au sens défini par les généticiens, c'est-à-dire une population de petite taille mais de diversité maximale.

Plusieurs méthodes sont possibles pour constituer une « core collection » dépendant de la connaissance de la structuration des populations de base, de la biologie de l'espèce, de son degré de domestication etc...

#### Méthode 1

La méthode la plus naturelle consiste en un échantillon aléatoire de la population. Cette méthode conduit à une bonne représentation statistique de la population mais n'évite pas les redondances. Elle peut par ailleurs s'avérer inefficace par des effets d'échantillonnage compte tenu du faible effectif sélectionné.

#### Méthode 2

Une autre méthode consiste à maximiser la diversité génétique échantillonnée après transformation des variables par une analyse permettant un choix portant sur une variabilité maximale et non biaisé par la colinéarité des variables. Cette méthode est connue sous le terme « principal core strategy ».

Cette méthode consiste d'abord à effectuer une analyse en composante principale (sur des variables quantitatives) ou une analyse factorielle des correspondances multiples (variables

qualitatives ou quantitatives codées) sur les variables mesurées et à calculer ensuite pour chaque individu de la population sa contribution relative à la diversité totale  $CRI_i$ .

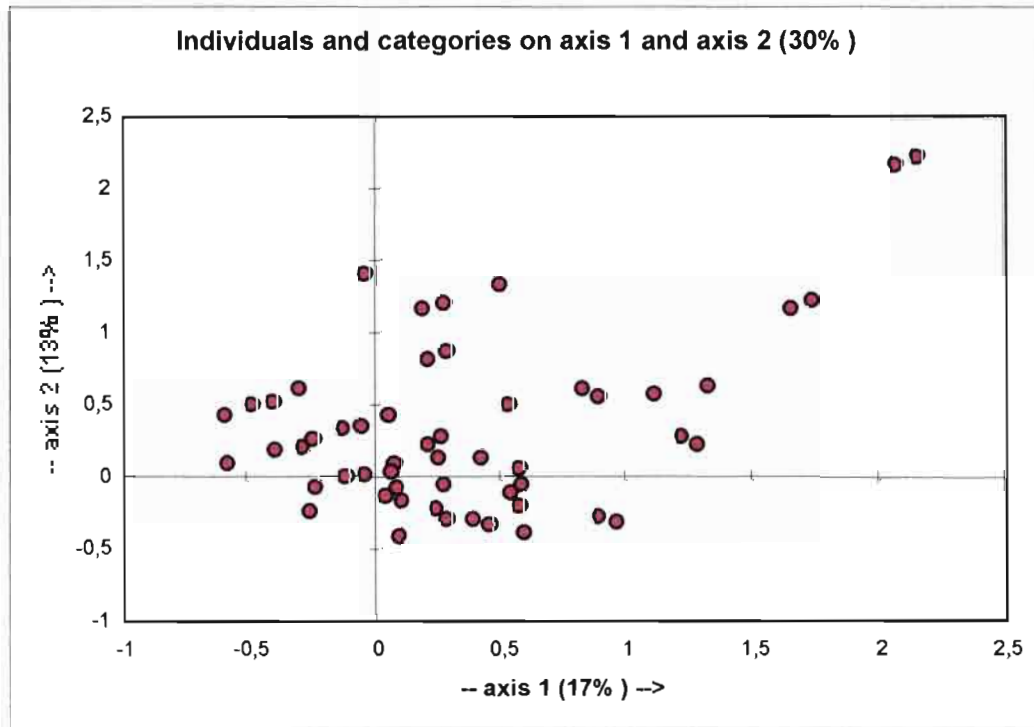
$CRI_i$  se calcule par la somme des coordonnées de l'individu dans l'hyperplan factoriel sur l'inertie totale du nuage de points c'est-à-dire la variabilité totale.  $CRI_i$  représente la part de la variabilité totale due à l'individu « i ».

Cette dernière méthode a été choisie pour faire une première estimation de la variabilité phénotypique prise en compte par l'établissement d'une « core collection » de 100 individus.

Le tableau de donnée 4.1 a été discrétisé en essayant d'avoir pour chaque variable un nombre de modalité similaire.

L'analyse factorielle des correspondances multiples a été ensuite réalisée pour calculer la contribution relative à la diversité de chaque individu.

La figure ci-dessous montre la façon dont se structure le nuage dans le plan formé par les deux premiers axes de l'analyse factorielle des correspondances multiples.



Le choix des individus sur la base d'une  $CRI$  décroissante conduit à une courbe d'évolution de la diversité cumulée en fonction du nombre d'individus ; cette évolution est illustrée par le graphique ci-dessous.

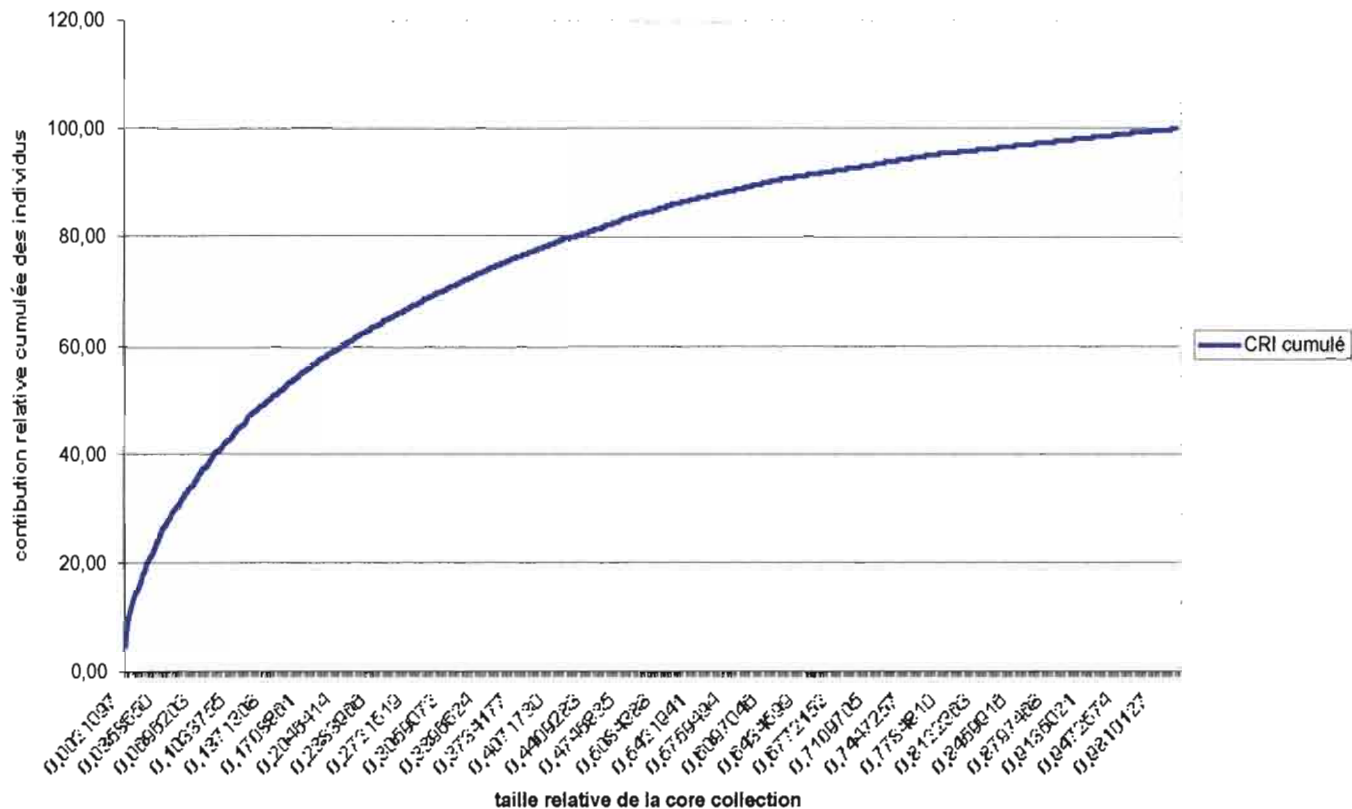
Avec 22% de la population sélectionnée, soit une centaine d'individus sur un hectare, 60% de la variation totale est prise en compte. Ce pourcentage paraît acceptable.

Il est encore trop prématuré pour désigner les arbres d'avenir (au sens de la maximisation de la variabilité) au sein de la parcelle. Les mesures ultérieures permettront d'affiner la sélection qui devra tenir compte aussi de la répartition des individus sur le terrain. Il sera aussi avantageux de

minimiser les effets environnementaux affectant chaque individu par des méthodes tenant compte des plus proches voisins.

Il sera sans doute aussi intéressant de sélectionner les individus sur des marqueurs moléculaires qui présentent certains avantages, notamment de maintenir la variabilité sur les variables quantitatives mais aussi de mieux préserver les allèles rares.

relation entre la taille relative de la core collection et le pourcentage de variabilité pris en compte



**Caractéristiques de la parcelle conservatoire ;  
 plantation réalisée en décembre 2000, station forestière de Paracou  
 Superficie 1 ha  
 Densité à la plantation 480 plans par ha ;  
 écartement : 2m entre les plants sur la ligne et 3m entre les lignes  
 2m entre la ligne et l'andain  
 andain largeur 3 m**

**Codification et  
 effectif**

<b>SITE</b>	<b>CODE</b>	<b>EFFECTIF</b>
Lysis	Lys	7
Gabrielle A2	Gb 2	12
Gabrielle	Gb-	3
Eskol (Hab°,b7)	Es	7
Eskol (Cacaoy)	Es	325
Eskol (7)	Es	7
Eskol	Es	55
Cacao Comté	Cac C	24
Agelas 7 & r 7	Agl 7	11
Agelas dl & 42 d Layon	Agl Ly	4
Agelas	Agl -	24
Agelas "a9"	Agl 9	1

