

Essais de multiplication du Pin d'Alep

par Lamia HAMROUNI, Mohsen HANANA, Gader GHAZI,
Rafik AINI et Mohamed Larbi KHOUJA

Le pin d'Alep occupe une place importante en Tunisie, aussi bien au point de vue écologique qu'économique. Il est cependant soumis à de fortes pressions qui conduisent à une régression importante des pineraies. Face à cette situation, les différents programmes de reboisement n'ont pas donné les résultats escomptés, malgré les efforts déployés. Une des solutions pour assurer la pérennité du pin d'Alep est la production de plants de qualité. Cet article nous présente une méthode de multiplication végétale pour aider au reboisement, en produisant des plants aptes à être exploités et utilisés.

Introduction

En Tunisie, la couverture forestière est en régression continue. En effet, l'exploitation très ancienne des terres est à l'origine d'un faible taux de boisement. Les formations forestières couvrent une superficie de près d'un million d'hectares, mais les forêts proprement dites ne dépassent pas les 500 000 ha environ, dont 270 000 ha de forêts naturelles, situées principalement dans le Nord-Ouest et le Centre du pays.

Ce patrimoine forestier aux fonctions multiples, de protection d'abord et de production ensuite, est l'objet d'une dégradation importante (CHANDOU, 1986). Il se réduit d'année en année avec pour conséquence un appauvrissement des ressources phyto-génétiques et, surtout, un développement du phénomène d'érosion aux conséquences désastreuses. D'autre part, les besoins du pays en produits ligneux vont sans cesse croissant, ce qui accroîtra inéluctablement la pression sur des formations forestières déjà très fragiles et surexploitées, provoquant ainsi des déséquilibres écologiques qui sont pour la plupart irréversibles (CHANDOU, 1986).

Cette situation n'est certes pas nouvelle, et les autorités du pays ont engagé plusieurs actions depuis l'indépendance pour y faire face ; en particulier, les reboisements. Mais pour donner des résultats, toutes les actions de développement forestier doivent être accompagnées par des efforts de protection contre les agressions auxquelles sont exposées ces forêts, aussi bien naturelles qu'artificielles.

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* M.) est, en surface, la première essence de la forêt tunisienne. Cette espèce rustique, caractéristique du climat méditerranéen semi-aride, couvrait, vers les années 1950, plus de 400 000 hectares. Cette superficie est estimée actuellement à 170 000 hectares (CHAKROUN, 1986). Malgré cette importante régres-

sion, le pin d'Alep reste encore, du point de vue superficie, l'essence forestière la plus importante en Tunisie (SGHAIER et PALM, 2002).

En outre, en raison de ses divers produits, le pin d'Alep occupe une place importante dans l'économie forestière du pays. Ces produits sont largement utilisés pour les besoins de la menuiserie commune, de la charpente ordinaire, de la caisserie, des emballages et du coffrage ; sans oublier de rappeler la bonne aptitude du bois aux utilisations papières et à la fabrication de panneaux de particules (DAHMANE, 1986).

En plus de ces produits, il existe une demande très grande en graines de pin d'Alep pour la préparation d'une crème pâtissière traditionnelle. La récolte des graines destinées à cet usage est de nature à augmenter dans une grande mesure les recettes provenant des forêts de pin d'Alep. En effet, les 30 kg de graines de pin d'Alep produits par un hectare de forêt à raison de 2 dinars (environ 1 euro) le kilogramme, représentent plus de 4 fois la valeur actuelle de la production ligneuse à l'hectare (CHAKROUN, 1986).

Les principales causes de la dégradation des pinèdes sont : les conditions pédoclimatiques peu favorables à la germination des graines et à la survie des jeunes plantes ; les incendies qui représentent un véritable fléau (NUNEZ et CALVO, 2000) ; le déboisement des arbres et le défrichement (CHAKROUN, 1986) ; et, récemment, un problème d'auto-toxicité évoqué par FERNANDEZ *et al.* (2008) qui fait aussi obstacle à la régénération naturelle de cette espèce.

La régénération naturelle des pins est donc très irrégulière et a toujours posé de sérieux problèmes, surtout pour les peuplements très âgés. Or, la majorité des programmes d'aménagement et de conservation de ces ressources ne compte encore que sur la régénération naturelle.

L'exploitation des forêts de pin d'Alep se fait après martelage conformément aux procès-verbaux d'aménagement, soit en régie soit à l'entreprise. La production ligneuse potentielle s'élève à 150 000 m³ par an. Néanmoins l'absence de régénération naturelle engendre un retard important au niveau de l'application des aménagements et la production réelle atteint à peine la moitié de la possibilité théorique de la forêt (CHAKROUN, 1986). Ce retard est dû aux difficultés insurmontables en matière de mise en

défens des peuplements, ce qui a engendré un échec total de la régénération naturelle.

Par ailleurs, les résultats des reboisements effectués à travers les différents plans de développement nationaux n'ont pas été à la hauteur de la volonté et des efforts déployés, ni en terme de taux de réussite des plantations réalisées, ni en terme de croissance et de productivité des reboisements (AMMARI *et al.*, 2006). Diverses causes étaient à l'origine de ce résultat, parmi lesquelles la qualité des plants produits en pépinière, considérée comme l'un des facteurs limitant l'installation et la survie des jeunes semis en site de plantation (BURDETT, 1983 ; SUTTON, 1988 ; AMMARI *et al.*, 2006). En effet, l'absence de critères d'évaluation d'ordre morphologique et physiologique des plants et le manque de normes spécifiques constituent un frein majeur à l'amélioration des techniques de production et à leur généralisation. Bien que différentes techniques de production de plants aient été développées et adaptées selon des caractéristiques spécifiques, celles-ci remontent à plusieurs décennies et n'ont pas connu d'amélioration majeure depuis leur origine.

Dans la politique de reboisement, l'accent a été mis beaucoup plus sur l'installation d'arboretums pour faciliter le choix des essences à reboiser et sur les travaux mécanisés de préparation du sol, que sur l'efficacité des techniques de production (LAMHAMEDI *et al.* 2000). L'inauguration de pépinières modernes avec introduction de nouvelles technologies de production (ombrière, conteneurs, compost, irrigation automatique, mycorhization, fertilisation et informatisation des données) et de gestion des cultures avec une capacité de production d'un million de plants par pépinière a été effectuée dans des projets pilotes (LAMHAMEDI *et al.*, 1995, 1997). Un des objectifs de cette nouvelle génération de pépinières était de produire des plants de bonne qualité tout en respectant certaines normes morphologiques et physiologiques. Malheureusement, la généralisation de cette modernisation et la divulgation de ces procédés n'ont pas connu l'ampleur et la réussite escomptées (LAMHAMEDI *et al.*, 2000). La production des plants en pépinière en Tunisie varie en fonction des tranches de reboisement, elle atteint 4,5 millions pour le pin d'Alep (LAMHAMEDI *et al.*, 2000). La plantation, qui s'échelonne de novembre à février, s'effectue toujours après les premières pluies d'automne (CHAKROUN, 1986). Il est à noter

qu'à l'échelle expérimentale, seule la régénération par plantation en poquets ou les semis directs après travail mécanique du sol, ont pu donner des résultats probants (CHAKROUN, 1986). Ainsi, pour assurer la survie de cette espèce ainsi que son maintien dans son écotype d'origine, une multiplication en masse des génotypes performants s'avère donc d'une nécessité impérieuse (KHOUJA, 1997). Dès lors, il semblerait que le seul moyen d'assurer la pérennité de la forêt de pin d'Alep est de recourir à de nouvelles techniques, telles que la culture *in vitro*. Ainsi, différents modes de multiplication du pin d'Alep en particulier les possibilités de sa culture *in vitro*, des essais de multiplication par semis et par bourgeonnement axillaire ont été menés sur des plantules de pin d'Alep en vue d'obtenir de manière rapide et simple un nombre élevé de plants aptes à être exploités et utilisés par la suite dans un programme de reboisement.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de graines prélevées sur des arbres adultes de pin d'Alep provenant des régions du Kef et de Kasserine, principaux réservoirs du pays de cette essence forestière (Cf. Tab. I et Fig. 1) puis conservées dans une chambre froide à 4°C. Les deux provenances choisies se caractérisent également par une bonne qualité des graines du point de vue pouvoir germinatif et de critères organoleptiques et chimiques (faibles teneurs en polyphénols, réduisant ainsi le risque d'intoxication alimentaire). Aussi, des boutures herbacées et ligneuses (10-15 cm) ont été respectivement prélevées à partir de jeunes plantules cultivées dans une serre vitrée et âgées de 8 mois, et d'arbres adultes des sites du Kef et de Kasserine. Ces boutures sont excisées en plusieurs fragments qui vont constituer les microboutures à utiliser *in vitro*.

Méthodologie

Multiplication *ex vitro* (germination et bouturage)

Désinfection du matériel végétal

Pour la multiplication *ex vitro*, les graines sont désinfectées par trempage dans une solution de fongicide (Benlate 2g/l) pendant

Région	Situation géographique	Climat	Pluviométrie
Kef	Nord-ouest	Semi-humide	400-500 mm/an
Kasserine	Centre Ouest	Semi-aride	300-400 mm/an



Tab. I (ci-dessus) :
Caractéristiques climatiques des régions du Kef et de Kasserine

Fig. 1 (ci-contre) :
Carte de la Tunisie mentionnant les régions du Kef et de Kasserine.

45 minutes puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée. Les boutures (10-15 cm) herbacées et ligneuses sont prélevées au dessus du nœud et sont désinfectées comme les graines, mais font l'objet d'un trempage supplémentaire de leur partie basale dans une solution d'auxine commerciale (exubérone) durant une heure afin d'induire la rhizogénèse.

Mise en culture

Les graines de chaque provenance ont été semées dans des plaquettes alvéolées (composées de 15 alvéoles) remplies de substrat inerte (perlite) et placées dans une chambre de culture sous des conditions contrôlées (température : 25°C, humidité relative (HR) : 80 %, photopériode : 16 h, éclairage d'appoint : 1500 lux) ou bien dans une serre vitrée (température : 25°C +/-2, photopériode : 16 h, HR : 60 %, éclairage naturel). Les boutures désinfectées sont repiquées dans des plaquettes remplies de perlite et arrosées un jour sur deux avec de l'eau de robinet. Les deux types de culture (germination et bouturage) ont été effectués selon un dispositif aléatoire avec 10 répétitions.

Protocole	Fongicide (Pelt44)	Bichlorure de mercure (HgCl ₂ , 1 %)	Javel commercial (12°)
P1	30 mn	10 mn	10 mn (12°)
P2	45 mn	15 mn	15 mn (9°)
P3	1 heure	20 mn	15 mn (6°)
P4	1 heure	20 mn	15 mn (3°)

Tab. II :
Protocoles de désinfection
des graines de pin d'Alep
cultivées *in vitro*

Multiplication *in vitro* (germination et microbouturage)

Désinfection du matériel végétal

Pour la multiplication *in vitro*, les deux types de matériel végétal (graines et microboutures) sont désinfectés d'une manière différente (Cf. Tab. II et III). En effet, les boutures lignifiées infestées d'agents pathogènes, nécessitent un protocole de désinfection plus sévère que celui des boutures herbacées ou des graines qui sont plus sensibles aux désinfectants.

Mise en culture *in vitro*

Après désinfection des graines et des microboutures, celles-ci sont rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile sous hotte à flux laminaire et mises en culture respectivement dans des boîtes de Pétri et des tubes à essai contenant un milieu de culture nutritif MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) additionné de 30 g/l saccharose et 8 g/l gélose pour solidifier le milieu. Le pH du milieu est ajusté à 5,7 avant autoclavage (110°C, 15 mn). Après ensemencement des explants, les cultures ont été placées dans la chambre de culture.

Tab. III :
Protocoles de désinfection
des microboutures
de pin d'Alep

Nature du matériel végétal prélevé	Protocole de désinfection
Bouture herbacée	<ul style="list-style-type: none"> – Nettoyage avec de l'eau savonneuse ; – Trempage dans une solution de fongicide pendant une heure ; – Trempage dans une solution de bichlorure de mercure (1%) durant 15 minutes ; – Passage rapide à l'alcool 70° ; – Trempage dans une solution de javel commercial (6°) durant 15 minutes.
Bouture ligneuse	<ul style="list-style-type: none"> – Nettoyage avec de l'eau savonneuse ; – Trempage dans une solution de fongicide pendant une heure et demie ; – Trempage dans une solution de bichlorure de mercure (1%) durant 30 minutes ; – Un passage rapide à l'alcool 70° ; – Trempage dans une solution de javel commercial (6°) durant 20 minutes.

Résultats

Germination *ex vitro*

Les taux de germination enregistrés dépassent toujours 80 % quelle que soit la provenance de pin et le lieu de culture (chambre de culture ou serre). Cela indique une bonne capacité germinative des graines de pin. Nous n'avons pas constaté de différence de capacité germinative entre les deux provenances de pin (Cf. Fig. 2). Néanmoins, l'utilisation de la chambre de culture permet d'obtenir un meilleur taux de germination (supérieur à 90%) que la serre pour les deux provenances. Cela est dû aux conditions de culture dans la chambre de culture, beaucoup mieux maîtrisées et plus stables que dans la serre. Après la phase de germination, les jeunes plantules présentent un système racinaire pivotant de 4 à 5 cm de longueur. Après 20 jours, les plantules sont repiquées dans des plaquettes remplies de perlite et placées dans une serre vitrée en vue de leur acclimatation avant leur transfert au champ. La réussite de ces étapes successives ne pose pas problème. Trois principales phases sont à distinguer au cours de la germination :

- l'émergence de la radicule à l'extérieur des téguments et qui dure une semaine puis,
- une expulsion des téguments et une accentuation de la courbure de l'hypocotyle et qui dure deux semaines et enfin,
- l'ouverture cotylédonnaire (Cf. Photo 1).

La racine primaire développe alors des racines secondaires qui pourront à leur tour en porter d'autres et ainsi de suite.

Germination *in vitro*

Différents protocoles de désinfection ont été testés en raison de la sensibilité des graines aux contaminations fongique et bactérienne au cours de la culture *in vitro*. Malgré cela, la technique de culture *in vitro* n'a pas permis d'atteindre les résultats escomptés. En effet, la majorité des protocoles de désinfection utilisés n'ont pu éviter totalement la contamination qui aurait une origine probablement endogène. Le protocole 1 n'a pas du tout éliminé la contamination (100% contamination et 0% germination). Le protocole 2 a réduit remarquablement la contamination (5 %) mais n'a permis aucune germination, à cause de l'intensité du traitement de désinfection qui a dû être toxique pour l'embryon au sein de la graine. Les protocoles 3 et 4 sont les plus efficaces quant à

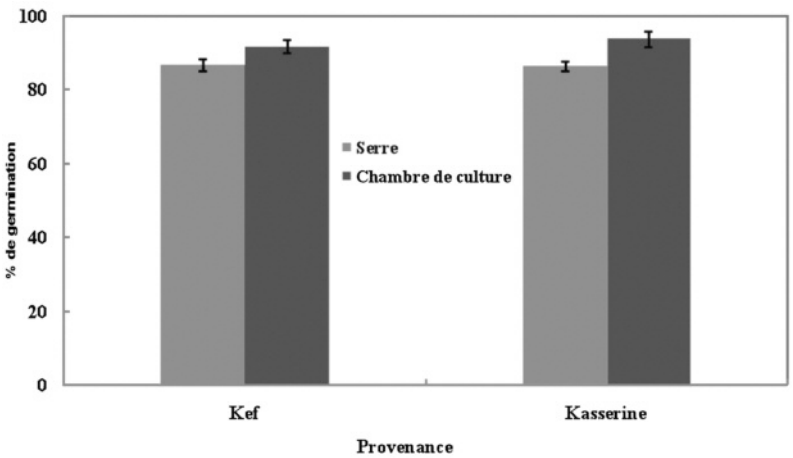
l'éradication du problème de contamination, cependant comme pour le protocole 2, ils sont trop toxiques pour permettre la germination des graines. Ainsi, même avec différents protocoles de désinfection et en essayant plusieurs alternatives de traitements par des fongicides systémiques, des trempages rapides dans l'alcool, et en faisant varier le temps d'action des produits de désinfection, il a été difficile d'obtenir des graines non contaminées et germant.

Bouturage ex vitro

Le bouturage du pin sous serre n'a pas permis d'obtenir des résultats probants pour aucun type de bouture (herbacée et ligneuse). En effet, la majorité des boutures se dessèchent et finissent par nécroser sans manifester une reprise d'activité végétative ni de rhizogénèse.

Microbouturage in vitro

Les résultats obtenus au niveau des essais de microbouturage montrent une grande variabilité en fonction de la nature des boutures. En effet, une réussite quasi-totale a été obtenue avec un matériel végétal de départ herbacé (98%) alors que l'utilisation de boutures ligneuses s'est soldée d'un échec avec seulement 5 % de débourrement et de reprise végétative (Cf. Tab. IV). Après 3 à 4 mois de culture *in vitro* sur le milieu MS, les microboutures émettent des racines et continuent leur développement *in vitro* jusqu'à leur transfert en pot sous serre après quelques mois pour assurer leur acclimatation et adaptation en serre.



Conclusion

Notre travail a été effectué dans le but de mettre au point une technique de multiplication *ex vitro* et/ou *in vitro* du pin d'Alep compte tenu de l'importance de ce dernier pour le reboisement des forêts en Tunisie. Suite aux essais réalisés dans ce cadre de travail, nous avons pu montrer que la germination *ex vitro* dans la perlite s'est avérée plus efficace que celle en conditions *in vitro*. Les essais de germination *in vitro* n'ont pas donné de résultats satisfaisants en raison de la forte contamination, difficile à éradiquer ou à réduire sans porter atteinte au processus de germination suite à l'intensité et l'agressivité des traitements de désinfection appliqués. C'est ainsi qu'il s'avère plus intéressant de faire la germination dans de la perlite en chambre de culture (ou en serre) car elle permet d'obtenir un taux de germination supérieur à 90%. Les travaux de bouturage sous serre ont montré que les boutures repiquées sont récalcitrantes et inapt

Photo 1 (en haut) :
Les différentes étapes de germination du pin d'Alep

Fig. 2 (ci-dessus) :
Taux de germination de *Pinus halepensis* M. (provenances du Kef et de Kasserine) sous serre et en chambre de culture.

Photo 2 (en bas, à gauche) :
Débourrement et reprise de croissance d'une microbouture de pin d'Alep

Tab. IV (ci-dessous) :
Pourcentage de débourrement des microboutures de pin d'Alep

Nature des boutures prélevées	% de débourrement
Bouture ligneuse	5
Bouture herbacée	98

Lamia HAMROUNI
Mohamed Larbi
KHOUBA
Laboratoire d'écologie
et d'amélioration
sylvo-pastorale,
Institut national de
recherches en génie
rural, eaux et forêts,
BP 10, 2080 Ariana
Tunisie

Mohsen HANANA
Laboratoire
de physiologie
moléculaire des
plantes, Centre
de biotechnologie de
Borj-Cédria, BP 901
Hammam-lif
2050 Tunisie

Gader GHAZI
Rafik AINI
Direction générale
des forêts, Tunisie

Auteur
pour correspondance :
Lamia HAMROUNI
Mél :
hamrounilam@
yahoo.fr
Tél. : 00(216)71230039

à reprendre leur croissance. Toutefois les essais de multiplication de pin d'Alep réalisés par microbouturage ont montré que le pin d'Alep est une espèce facile à régénérer par la culture *in vitro* et le pourcentage de contamination est nul avec l'utilisation du matériel végétal herbacé qui offre un taux de réussite maximal, prometteur pour la multiplication de l'espèce.

Références bibliographiques

- Ammari Y., Lamhamedi M.S., Akrimi N., Zine El Abidine A., 2006. Qualités physiologiques de jeunes plants de pin d'Alep élevés en pépinière moderne sur différents substrats à base de compost. *Geo-Eco-Trop*, 30(1): 11-24.
- Burdett A.N., 1983. Quality control in the production of forest planting stock. *Forestry Chronicle*, 59: 132-138.
- Chakroun M.L., 1986. Le pin d'Alep en Tunisie. *CIHEAM - Options Méditerranéennes*. 25-27.
- Chandoul H., 1986. La protection des forêts en Tunisie. *CIHEAM - Options Méditerranéennes*. 201-203.
- Dahmane M., 1986. Les produits du pin d'Alep en Tunisie. *CIHEAM - Options Méditerranéennes*. 157-161.
- Fernandez C., Voiriot S., Mévy J-P., Vila B., Ormeno E., Dupouyet S., Bousquet-Mélou A., 2008. Regeneration failure of *Pinus halepensis* Mill. : The role of autotoxicity and some abiotic environmental parameters. *Forest Ecology and Management*, 255 : 2928-2936.

Khouja M.L., 1997. Variabilité géographique du pin d'Alep en Tunisie perspectives d'amélioration de la productivité et de la qualité physique du bois. Thèse de Doctorat, UCL, Agro, Faculté des Sciences Agronomiques, Belgique.

Lamhamedi M.S., Ksontini M., Fecteau B., Fortin J.A., de Chantal M., 1995. Éléments de réflexion sur le substrat d'élevage des plants dans trois pépinières forestières pilotes en Tunisie. Montréal : Pampev Internationale, Direction générale des Forêts, Tunis, Projet Banque mondiale n° 3601, 16 p.

Lamhamedi M.S., Fortin J.A., El Ammari Y., et al. 1997. Évaluation des composts, des substrats et de la qualité des plants (*Pinus pinea*, *Pinus halepensis*, *Cupressus sempervirens* & *Quercus suber*) élevés en conteneurs. Montréal : Pampev Internationale, Direction Générale des Forêts, Tunis, Projet Banque mondiale n° 3601, 130 p.

Lamhamedi M.S., Ammari Y., Fecteau B., Fortin J.A., Margolis H.A., 2000. Problématique des pépinières forestières en Afrique du Nord et stratégies d'orientation. *Cahiers Agricultures*, n° 9 : 369-380.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Vol 15 : 473-497.

Nunez M.R., Calvo L., 2000. Effect of high temperatures on seed germination of *Pinus sylvestris* and *Pinus halepensis*. *Forest Ecology and Management*, 131 : 183-190.

Sghaier T., Palm R., 2002. Répartition des arbres et des volumes par classes de grosseur dans les peuplements de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Tunisie. *Ann. For. Sci.*, Vol 59 : 293-300.

Sutton R.F., 1988. Planting stock quality is fitness for purpose. In "Taking stock: The role of nursery practice in Forest renewal". Smith C.R. and Riffele R.J. Eds., Symp.Proc. O-P-16, Ontario: 39-43.

Résumé

Afin d'obtenir de manière efficace un nombre élevé de plants aptes à être exploités et utilisés dans un programme de reboisement, nous avons cherché à développer la multiplication du pin d'Alep. A cet effet, différentes méthodes ont été essayées, en particulier les possibilités de sa culture *in vitro*, des essais de multiplication par semis et par bourgeonnement axillaire. La germination *ex vitro* du pin, particulièrement celle réalisée en chambre de culture, a atteint un taux de germination supérieur à 90%. *In vitro*, nous avons été confronté à un problème de contamination des graines qui a constitué un véritable obstacle pour la germination. Par ailleurs, les essais de bouturage *ex vitro* n'ont pas été concluants en raison du dessèchement et de la nécrose rapides des boutures. Nous avons en revanche réussi le micro-bouturage *in vitro* avec un matériel végétal herbacé (98% de réussite) qui, une fois enraciné et au bout de 3 ou 4 mois de culture *in vitro*, est transféré sous serre pour acclimatation.

Summary

Reproduction trials for the Aleppo pine

With the aim of developing the reproduction of the Aleppo pine, we sought to obtain efficiently a large number of plants suitable for deployment and use in a reforestation programme. To this end, various methods were tested, in particular the potential of *in vitro* culture, trials with seeds and lateral budding. *Ex vitro* germination of the species achieved a more than 90% success rate, above all when carried out in a dedicated sowing facility. *In vitro*, we were faced with a problem of contamination that proved to be a real obstacle to germination. Other trials with *ex vitro* cuttings did not prove convincing on account of rapid drying out and dying off of the cuttings. In contrast, *in vitro* micro-slips of green material achieved a 98% success rate and, after root development and a 3-4 month period of *in vitro* culture, were transferred to a greenhouse for acclimatisation.