

UNIVERSITÉ MOHAMMED V – AGDAL
FACULTÉ DES SCIENCES
Rabat



N° d'ordre : 2659

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Kawtar BENNANI

Discipline : Biologie
Spécialité : Agro-physiologie

Analyse de la diversité agro-physiologique d'écotypes locaux de certaines légumineuses fourragères annuelles et recherche de potentialités liées au stress salin

Soutenue le 6 juillet 2013

Devant le jury

Président :

Najib BENDAOU

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

Examineurs :

Chaouki AL FAIZ

Zine El Abidine TRIQUI

El Houssine ZAID

Nadia BELAHBIB

Directeur de recherche à l'INRA de Rabat

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

Professeur à la Faculté des Sciences de Kénitra

Invitée :

Rajae KALLIDA

Ingénieur en chef principal à l'INRA de Rabat

À mes parents qui m'ont toujours soutenu et qui

continuent de le faire

À mon frère Hicham

À mes sœurs Hajar et Ikram

Avant propos

Cette thèse s'achève et commence par les indispensables remerciements pour tous ceux qui m'ont accompagné et m'ont soutenu au long de ces années.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales de la Faculté des Sciences de Rabat sous la direction de Professeur Najib BENDAOU en collaboration avec l'Unité d'Amélioration, Conservation et Valorisation des Ressources Phytogénétiques à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Rabat sous la direction de Monsieur Chaouki AL FAIZ.

Je tiens à exprimer tout d'abord mes plus sincères remerciements à Monsieur Najib BENDAOU, professeur et chef de département de Biologie à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir apporté son expertise tout au long de cette thèse. Ses conseils ainsi que ses critiques m'ont été d'un apport précieux. Je lui suis particulièrement reconnaissante de m'avoir toujours réservé une partie de son temps et de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Ma profonde gratitude va à Monsieur Chaouki AL FAIZ directeur de recherche et coordinateur de l'unité d'amélioration des plantes, conservation et valorisation des ressources phytogénétiques à l'INRA de Rabat qui m'a proposé le thème de ce travail. J'ai beaucoup appris avec lui aussi bien sur les plans scientifique, théorique et pratique que sur le plan humain. Je voudrais aussi le remercier pour l'encadrement, la patience, l'amabilité et la confiance qu'il m'a accordés tout au long de ces années, d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir fourni de nombreuses facilités pour mener à terme ce travail.

Je suis particulièrement reconnaissante à Monsieur Zine El Abidine TRIQUI Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir accepté aimablement de ménager son temps pour faire le rapport de ce travail, et de participer au jury de cette thèse.

Je suis vivement reconnaissante à Monsieur El Houssine ZAID, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir accepté volontairement de juger et d'examiner ce travail ainsi de m'avoir honorée par sa participation au jury de cette thèse.

Je remercie sincèrement Madame Nadia BELHABIB Professeur à la Faculté des Sciences de Kénitra d'avoir eu l'amabilité de juger et de faire le rapport de ce travail.

Mon appréciation et ma reconnaissance vont aussi à Madame Rajae KALLIDA, Ingénieur Agronome en chef principal, spécialiste des cultures fourragères à l'INRA de Rabat pour son intérêt porté pour mon sujet de recherche et pour les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec elle au démarrage de mes travaux de thèse ainsi que d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime aussi ma reconnaissance à Madame Fatima GABOUN, Ingénieur en chef à l'INRA de Rabat, qui a bien voulu m'aider avec patience aux analyses statistiques, malgré son emploi du temps très chargé.

Je remercie également Monsieur Miloud EL KARBANE, Ingénieur au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments de Rabat pour avoir accepté aimablement de faire les analyses de l'Ultra Performance Liquid Chromatography.

Enfin, une pensée émue pour mon amie *Loubna Terhzaz*. Merci aussi à tout le personnel que j'ai rencontré à l'INRA de Rabat ainsi qu'à tous mes amis : *El Atyouni J., Cherradi S., Shaimi N., Boumassri A., Bary S., Bakhy K., Zennouhi R., Chentoufi S., Ouldezza F., Rachidi G., Alami A., Bouhaddou N., Gmouh S., Hamidi H, Nabloussi A., Maurel C. et Haouala F.*, pour leurs mots encourageants.

Liste des publications

Les travaux effectués dans cette thèse ont contribué aux publications et communications suivantes :

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

Conservation and multivariate analysis utility in characterization of ecogeographical relationships of *Trifolium* and *Lotus* species. Bennani K., Thami Alami I., Bendaou N., Gaboun F et Al Faïz, C. *African Journal of Ecology*. 49 (1), 1–9. 2011.

Évaluation morphologique et agronomique de soixante populations marocaines des genres *Trifolium* et *Lotus* Fourrages. Bennani K., Thami Alami I. et Al Faïz, C. *Fourrages*. 204, 239-245. 2010.

Characterisation of Moroccan populations of *Trifolium* and *Lotus* species. Bennani, K., Thami Alami I., Bendaou N. et Al Faïz, C. *Options méditerranéennes*. 92, 251-255. 2010.

Communications dans des colloques nationaux et internationaux

Poster intitulé: “Alternative pastures and improving forage of native legume populations”. Bennani, K., Bendaou, N. et Al Faïz, C., Les Journées Doctoriales 2013 de la FSR. Rabat. 15-16 Janvier 2013.

Poster intitulé: “Biodiversity of Moroccan populations of *Trifolium* and *Lotus* species”. Bennani, K., Thami Alami, I., Bendaou, N. et Al Faïz, C., 13th meeting of the Sub-network FAO on Mediterranean pastures and fodder crops. “The contribution of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity”. Alicante (Espagne). 7-10 avril 2010.

Poster intitulé: “Caractérisation préliminaire d'une collection d'écotypes locaux de *Trifolium* sp. et *Lotus* sp. ”. Bennani, K., Bendaou, N., Thami Alami, I. et Al Faïz, C., V^{èmes} Journées Nationales de Biodiversité. « Biodiversité au service du développement durable ». Fès. 18-19 Décembre 2009.

Résumé

En vue de développer de nouvelles variétés fourragères appartenant au genre *Trifolium* et *Lotus*, à partir d'écotypes marocains adaptés aux conditions locales, l'évaluation du matériel végétal issu d'une collecte réalisée par l'INRA dans différentes régions du Maroc, a été entreprise. Les données climatiques et édaphiques des sites de collecte, ont servi de base à l'étude de la distribution des plantes, ainsi que l'influence de la provenance sur leurs caractéristiques morphologiques et agronomiques pour la sélection de différents écotypes. En première partie les résultats ont montré la prédominance de *T. isthmocarpum* et *L. ornithopodioides* vu leur large spectre d'adaptation. De même, ils ont montré des performances agronomiques similaires à la variété commerciale Paradana.

En deuxième partie, des écotypes ont été présélectionnés sur la base de leur valeur agronomique pour une évaluation plus approfondie concernant des critères de qualité fourragère et de tolérance aux stress salin. L'étude de la germination sous stress salin a été utilisée comme test préliminaire de la tolérance à la salinité. Elle s'est avérée confirmée aux stades ultérieurs à l'exception de *T. cherleri*. Cette espèce a manifesté des taux de germination élevés sur 137 mM (NaCl) avec une faible réduction de germination (<50%) sur 220 mM, tandis qu'elle n'a pas maintenu cette tolérance au stade végétatif. D'un point de vue physiologique, on a pu mettre en évidence le mécanisme de tolérance adopté pour chaque espèce. Les espèces *T. isthmocarpum* et *T. scabrum* ont développé un système d'exclusion de Cl^- comme mécanisme de tolérance au sel à côté d'une bonne sélectivité du potassium vu leur rapport K^+ / Na^+ élevé et voisin de 1 sur 220 mM. Toutefois *T. isthmocarpum* a montré une tolérance supérieure à la variété commerciale Paradana.

L'interaction écotype-milieu a montré une corrélation positive entre les résultats obtenus sous serre et ceux en plein champ, particulièrement chez des écotypes de *T. isthmocarpum* qui ont montré tout au long de l'étude une performance vis-à-vis de tous les paramètres testés, d'où l'intérêt potentiel de l'exploiter comme nouvelle espèce fourragère. Toutefois, elle a montré des teneurs élevées en flavonoïdes lorsqu'elle est cultivée sous irrigation saline. Un screening sur la base de substances anti-nutritionnelles est donc nécessaire pour aboutir à une véritable variété commerciale.

Mots clefs : Sélection, écotypes locaux, *Trifolium* spp, *Lotus* spp, salinité, phytoestrogènes

Summary

The evaluation of plant material derived from a collection made by INRA in different regions of Morocco was made, using Moroccan ecotypes adapted to local conditions, in order to develop new forage varieties of the genus *Trifolium* and *Lotus*. The climate and soil data collection sites were used as a basis for the study of the distribution of plants, and the influence of the origin of morphological and agronomic traits for selection of different ecotypes. As shown in the first part of the thesis, *T. isthmocarpum* and *L. ornithopodioides* were two prevalent species, given their wide range of adaptation. Both species showed agronomic performance similar to commercial variety (Paradana).

In the second part of this work, the ecotypes were screened on the basis of their agronomic value as an evaluation criterion for forage quality and tolerance to salt stress. Seed germination under salt stress was used as a quantitative measure of tolerance to salinity. It proved confirmed at later stages, with the exception of *T. cherleri*. This species showed high germination rate at 137 mM (NaCl) with a small reduction in germination (<50%) at 220 mM. While, it did not maintain this tolerance at the vegetative stage. From a physiological point of view, the tolerance mechanism adopted for each species was defined as following. Species *T. isthmocarpum* and *T. scabrum* were efficient in Cl^- exclusion, as well as had a good selectivity for potassium, with observed K^+/Na^+ ratio close to 1 when exposed to 220 mM NaCl. However *T. isthmocarpum* had much higher tolerance compared with commercial variety (Paradana).

The ecotype-environment interaction showed a positive correlation between the results obtained under greenhouse and those in the field for ecotypes of *T. isthmocarpum*. It could be used as a new forage species. However, it showed high levels of flavonoids when grown under saline irrigation. A screening on the basis of anti-nutritional substances is needed to achieve a genuine commercial variety.

Keywords: Selection, local ecotypes, *Trifolium* spp, *Lotus* spp, salinity, phytoestrogens

Sommaire

Introduction générale	7
Chapitre 1. Revue bibliographique	10
I. Les légumineuses fourragères annuelles	11
1. Importance des légumineuses fourragères annuelles	11
1.1 Rôle des légumineuses fourragères dans les	11
1.2 Procédure de réhabilitation impliquant les légumineuses annuelles	11
2. Situation des légumineuses fourragères au Maroc (Historique)	12
3. Situation des légumineuses fourragères en Australie (Historique)	12
4. Légumineuses fourragères : le trèfle et le lotier	13
5. Botanique et biologie	14
5.1 Taxonomie et aire géographique	14
5.2 Morphologie	15
6. Exigences édapho-climatiques et données écophysologiques	22
7. Techniques de production	23
7.1 Place dans l'assolement et l'occupation du sol	23
7.2 Installation	23
7.3 Fertilisation	23
7.4 Exploitation et entretien	24
7.5 Maladies et parasites	24
7.6 Symbiose	25
7.7 Composition chimique, valeur alimentaire et productivité	25
7.8 Pouvoir de résilience des légumineuses annuelles	26
II. Les légumineuses fourragères annuelles et la salinité	27
1. Notion de la salinité	27
1.1 Salinisation du sol	27
1.2 Salinisation des eaux d'irrigation	28
2. Situation au Maroc	28
3. Paramètres affectés par la salinité	30
3.1 Effet de la salinité sur la germination	30
3.2 Effet de la salinité sur le stade végétatif	30
3.3 Effet sur la nodulation	31
4. Résistance et survie à la salinité chez les légumineuses fourragères annuelles	32
5. Stratégies d'adaptations et mécanismes morphologiques de survie à la salinité	32
5.1 Réduction de la surface foliaire	32
5.2 Conductance stomatique	33
5.3 Succulence	33
6. Stratégies d'adaptations et mécanismes physiologiques de survie à la salinité	34
6.1 Homéostasie cellulaire	34
6.2 Sélectivité des ions	34
6.3 Synthèse d'antioxydants (exemple : les phytoestrogènes)	35
6.4 Synthèse de protéines induites par le sel	36
6.5 Accumulation d'osmoprotectants	37
6.6 Régulation de croissance	38

6.7 Ajustement osmotique	38
6.8 la floraison	36
7. Conclusion de la synthèse bibliographique et présentation des grands axes de la thèse	40
Chapitre 2. Evaluation d'une collection marocaine de légumineuses annuelles de trèfle et lotier	42
1. Introduction	43
2. Matériels et méthodes	44
2.1 Présentation du matériel génétique	44
2.2 Site et dispositif expérimentaux	44
2.3 Mesures effectuées	45
2.4 Analyses statistiques	46
3. Résultats	48
3.1 Description des traits morpho-phénologiques et agronomiques	48
3.1.1 Variation interspécifique	48
a) Traits morphologiques	48
b) Traits phénologiques	49
c) Traits agronomiques	49
d) Résistance aux maladies	50
3.1.2 Variation intraspécifique	50
a) Traits morphologiques et agronomiques	50
b) Groupement des écotypes de différentes espèces selon leur cycle végétatif	51
c) Résistance aux maladies	52
3.2 Analyses de corrélation entre traits morpho-phénologiques et agronomiques	53
3.3 Influence des facteurs climatiques des sites de collecte	53
3.4 Analyse en composantes principales et classification hiérarchique	54
a) Selon les variables morpho-phénologiques et agronomiques des écotypes	54
b) Selon la présence des espèces en fonction des sites de collecte	55
c) Selon les paramètres géographiques et climatiques des sites de collecte	56
4. Discussion	57
4.1 Distribution des espèces suivant les paramètres climatiques et écogéographiques	57
4.2 Structure de la variation intra et interspécifique	58
Chapitre 3. Étude de l'effet de la salinité sur la germination et la croissance végétative de différents écotypes de trèfle et lotier	61
Introduction	62
A. Étude de l'effet de la salinité sur la germination des graines	63
1. Matériels et méthodes	63
1.1 Matériel végétal	63
1.2 Protocole de germination	64
1.3 Mesures et observations effectuées	64
1.3.1 Taux de germination final	64
1.3.2 Cinétique de germination	64
1.3.3 Moyenne de germination journalière	66
1.3.4 Réversibilité de l'action du sel	66
1.3.5 Toxicité des ions et des effets osmotiques sur la germination	66
1.3.6 Concentrations de Na ⁺ et K ⁺ dans les graines	66

1.3.7 Analyses statistiques	67
2. Résultats	67
2.1 Evolution du taux de germination final en fonction de la salinité	67
2.2 Cinétique de germination	70
2.3 Moyenne de germination journalière	74
2.4 Réversibilité de l'inhibition de la germination	75
2.5 Détermination de la toxicité des ions et des effets osmotiques sur la germination	77
2.6 Concentrations des ions Na ⁺ et K ⁺ dans les graines	78
3. Discussion	80
4. Conclusion	84
 B. Effet de la salinité sur la croissance végétative de 14 écotypes de trèfles et lotier	85
1. Matériels et méthodes	85
1.1 Conduite de l'essai	85
1.2 Installation de l'essai	85
1.3 Mesures effectuées	86
1.3.1 Surface foliaire des plantes	86
1.3.2 Indice de succulence	86
2.3.3 Taux de croissance relative	87
1.3.4 La production de biomasse.	87
1.3.5 Caractéristiques hydriques de la plante	87
1.3.6 Conductance stomatique	88
1.3.7 Effet du sel sur l'absorption ionique	89
1.3.8 Teneur en sucres solubles	89
1.3.9 Teneur en Proline	89
1.3.10 Analyses statistiques	90
2. Résultats	90
2.1 Surface foliaire	90
2.2 Indice de succulence	91
2.3 Dynamique de croissance	92
2.4 Matière sèche aérienne	94
2.5 Matière sèche racinaire	96
2.6 Teneur relative en eau des feuilles	96
2.7 Potentiel osmotique	98
2.8 Conductance stomatique	100
2.8.1 Comportement des écotypes en fonction des traitements	100
2.8.2 Relation entre la conductance stomatique et le potentiel osmotique	101
2.9 Teneur en ions	102
2.10 Teneur foliaire en sucres solubles totaux et en proline	105
2.11 Étude de la relation entre les paramètres étudiés	107
3. Discussion	108
4. Conclusion	112
Chapitre 4. Étude de l'influence de la salinité en plein champ sur le comportement et la teneur en phytoestrogènes d'écotypes de trèfles et lotier sélectionnés pour leur tolérance au sel	113
1. Introduction	114
2. Matériel et méthodes	115
2.1 Matériel végétal	115
2.2 Sites expérimentaux	115

2.3 Protocole expérimental	115
2.4 Mesures et observations effectuées	116
2.4.1 La floraison	116
2.4.2 Rendement en matière sèche	116
2.4.3 Sucres solubles totaux	116
2.4.4 Potentiel osmotique	116
2.4.5 Teneur en azote	117
2.4.6 Taux de germination final	117
2.4.7 Teneur en polyphénols	117
2.5 Analyses statistiques	118
3. Résultats	118
3.1 Conditions climatiques	118
3.2 Précocité de la floraison	118
3.3 Rendement en matière sèche	119
3.4 Sucres solubles totaux	120
3.5 Potentiel osmotique	120
3.6 Teneur en azote	122
3.7 Production de graines et capacité de germination	123
3.8 Teneur en phytoestrogènes	124
3.9 Analyses de corrélation entre les paramètres testés	126
4. Discussion	126
5. Conclusion	129
Conclusion générale et perspectives	130
Références bibliographiques	134
Annexes	155

Liste des figures

Figure 1. Caractéristiques de fleurs, fruits, feuilles de <i>Trifolium isthmocarpum</i> Brot. (a), <i>Trifolium michelianum</i> Savi (b) et <i>Lotus ornithopodioides</i> . L. (c).	19
Figure 2. Évaluation au champ (station de Guich) de la collection de trèfles et de lotiers	45
Figure 3. Effectif des écotypes du trèfle et lotier en fonction de la floraison exprimée en jours	52
Figure 4. Dispersion des populations de trèfle et de lotier dans le plan engendré par les deux premiers axes de l'ACP obtenue à partir des données morpho-phénologiques et agronomiques des populations	55
Figure 5. Dendrogramme sur la base des traits édapho-climatiques illustrant la similarité des vingt sites de collecte	56
Figure 6. Dispersion des sites de collecte dans le plan engendré par les deux premiers axes de l'ACP selon les variables géographiques et climatiques de chaque site (les sites 1 à 20).	57
Figure 7. Effets de NaCl (C1 0mM, C2 68 mM, C3 137 mM, C4 220 mM) sur la cinétique de germination des graines de 40 écotypes et de la variété Paradana mises à l'obscurité, à température constante 26 °C et une humidité relative variante de 78% à 93%.	70
Figure 8. Variation de la moyenne du taux de germination journalière (MDG) de 40 écotypes et de la variété Paradana en fonction de la concentration en NaCl: C1 (0 mM) ; C2 (68 mM) ; C3 (137 mM) et C4 (220 mM). Les graines sont mises à l'obscurité, à température constante 26°C et une humidité relative variante de 78% à 93%	75
Figure 9. Reprise de germination (RG) sur l'eau distillée après un prétraitement avec du chlorure de sodium 137 mM (a) et 220 mM (b) à l'obscurité, à température constante 26°C	79
Figure 10. Taux de germination des écotypes (TG %) –à taux de germination faible à nul sur 220 mM de chaque espèce– sur les milieux C1 (0mM) ; C2 (220 mM NaCl) et C3 (380 mannitol) après 20 jours d'incubation	78
Figure 11. Variation de la surface foliaire des écotypes de trèfle et de lotier soumis à différentes concentrations de NaCl : 0 mM () ; 137 mM () et 220 mM ().	91
Figure 12. Variation de l'indice de succulence foliaire des écotypes de trèfle et lotier soumis à différentes concentrations de NaCl : 0 mM () ; 137 mM () et 220 mM ().	91
Figure 13. Evolution du taux de croissance moyenne relative (CMR) des écotypes étudiés en fonction de la durée du stress salin, T1 (2 semaines après l'application du stress), T2 (2 semaines après la mesure en T1) et T3 (4 semaines après la mesure en T2).	93
Figure 14. Teneur relative en eau des feuilles (TRE %) de quinze écotypes de trèfle et de	97

lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (137 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines).

Figure 15. Potentiel osmotique (MPa) des écotypes de trèfle et de lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (137 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines). 99

Figure 16. Conductance stomatique CS ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) des écotypes de trèfle et de lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (137 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines). 101

Figure 17. Corrélation de Pearson entre la conductance stomatique (CS en $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) et le potentiel osmotique (Ψ en MPa) pour les différentes espèces sous les différents régimes salins 102

Figure 18. Evolution de la teneur en sucres solubles totaux (mg/g MF) des écotypes de trèfle et de lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (137 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines) 106

Figure 19. Evolution de la teneur en proline (mg/g MF) des écotypes de trèfle et de lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (137 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines). 107

Figure 20. Essais Guich (a) et Benabid (b) au stade floraison 119

Figure 21. Evolution des teneurs en sucres solubles totaux des écotypes testés sur les sites Guich (Témoin) (a) et Benabid (Salin) (b). Après 4 semaines (T1), 8 semaines (T2) et 12 semaines (T3). 121

Figure 22. Evolution du potentiel osmotique des écotypes testés sur les sites Guich (Témoin) (a) et Benabid (Salin) (b). Après 4 semaines (T1), 8 semaines (T2) et 12 semaines (T3). 122

Figure 23. Evolution des teneurs en azote des écotypes testés sur les sites Guich (Témoin) et Benabid (Salin) 123

Figure 24. Spectres d'absorption caractérisant les groupes de composés phénoliques identifiés dans les espèces de *Trifolium* et *Lotus* 125

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison des principales caractéristiques morphologiques des espèces étudiées	16
Tableau 2. Valeur énergétique (UF/kg MS) et Composition chimique selon les saisons (en % M.S.) chez quelques légumineuses annuelles	26
Tableau 3. Superficies (en ha) de certains périmètres irrigués du Maroc (Debbarh et Badraoui, 2002)	29
Tableau 4. Importance de la salinité d'eau d'irrigation dans certains périmètres irrigués du Maroc selon différentes études (Achheb <i>et al.</i> , 2001 ; Hsissou <i>et al.</i> , 2001; Lahlou <i>et al.</i> , 2002 ; Bannari <i>et al.</i> , 2008 ; Dakak <i>et al.</i> , 2013, Zouhri <i>et al.</i> , 2013)	29
Tableau 5. Liste des écotypes du <i>Trifolium</i> et <i>Lotus</i> , leur nombre et leurs sites d'origine	46
Tableau 6. Caractéristiques des sites de collecte des écotypes du <i>Trifolium</i> et <i>Lotus</i>	47
Tableau 7. Description des variables morpho-phénologiques et reproductives mesurées	48
Tableau 8. Comparaison de moyennes des traits observés pour les espèces étudiées de trèfle et de lotier	50
Tableau 9. Coefficients de corrélation entre traits morpho-phénologiques et agronomiques	53
Tableau 10. Influence des facteurs climatiques sur les critères morpho-phénologiques et agronomiques de différents écotypes	54
Tableau 11. Liste des écotypes étudiés et de leur origine (les caractéristiques de chaque site sont illustrées dans le Tableau 6-Chapitre 2 ; les écotypes mentionnés portent des chiffres indiquant les sites)	65
Tableau 12. Variation de la capacité germinative (%) des écotypes pour les différentes concentrations de NaCl (mM).	69
Tableau 13. Variation de la capacité germinative des espèces pour les différentes concentrations de NaCl (mM).	70
Tableau 14. Concentrations des ions Na^+ et K^+ ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de matière sèche) des graines imbibées et dures dans 0 mM, 137 mM et 220 mM de NaCl	79
Tableau 15. Liste et origine des écotypes utilisés (les caractéristiques de chaque site sont illustrées dans le Tableau 6-Chapitre 2)	85
Tableau 16. Variation de la matière sèche (g) des parties aériennes (MSA) et racinaires (MSR) en fonction des traitements 0 mM (C1), 137 mM (C2) et 220 mM (C3) prises à la fin de l'essai.	95
Tableau 17. Concentrations (mmol/g MS) des ions Na^+ , K^+ et Cl^- des parties aérienne (A)	104

et racinaires (R) et le rapport de sélectivité K^+/Na^+ de la partie aérienne des quinze écotypes, mesurées à la fin de la période expérimentale pour les différents traitements.

Tableau 18. Coefficients de corrélation entre les différents paramètres testés pour les trois traitements salins. 108

Tableau 19. Floraison des écotypes de trèfle et lotier et la variété Paradana sur les sites Guich (Témoin) et Benabid (Salin) 119

Tableau 20. Rendement en matière sèche (g/m^2) sur les sites Guich (Témoin) et Benabid (Salin). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions 120

Tableau 21. Paramètres de production et capacité de germination des écotypes cultivées de trèfle et lotier et de la variété Paradana 123

Tableau 22. Concentration des polyphénols (phytoestrogènes) ; les Flavonoïdes (Equivalent de formononétine), Isoflavones (Equivalent de daidzéine) et des coumestanes (équivalent de coumestrol) des écotypes testés sur les sites Guich (Témoin) et Benabid (Salin) ($\mu g/g$ MS $\pm$ écart-type) 125

Tableau 23. Coefficients de corrélation entre les différents paramètres testés sur les sites Guich (Témoin) et Benabid (Salin). 126

Abréviations

Alt	Altitude
CMR	taux de la Croissance Moyenne Relative
CE	Conductivité Electrique
CS	Conductance Stomatique
ETP	Evapo-Transpiration Potentielle
F	Floraison
GI	Graines par Inflorescence
HP	Hauteur de Plante
ICARDA	International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
IP	Inflorescence par Plante
IS	Indice de Succulence
Lat	Latitude
Log	Longitude
MS	Matière Sèche
MDG	Moyenne de Germination Journalière
P	Pluviométrie Annuelle Moyenne
Pro	Proline
PDA	Détecteur à barrettes de photodiodes
PG	Production de Graines par plante
PMG	Poids de Mille Graines
PO	Potentiel Osmotique
RG	Reprise de Germination
SAU	Surface Agricole Utile
SF	Surface Foliaire
SST	Sucres Solubles Totaux
TA	Teneur en Azote
TG	Taux de Germination final
TF	Taille de Feuille
TP	Teneur en Phytoestrogènes
TRE	Teneur Relative des feuilles en Eau
Tm	Température moyenne mois le plus froid
TM	Température moyenne de mois le plus chaud

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les parcours, les jachères, les forêts et les sous produits de la céréaliculture constituent les principales ressources fourragères au Maroc. Les cultures fourragères n'occupent que 6% de la SAU totale. En irrigué elles comprennent environ 36% de la superficie totale emblavée (Sraïri *et al.*, 2001). Le domaine fourrager marocain souffre de la rareté des ressources fourragères, saisonnalité de l'offre en fourrages, ainsi que faiblesse de l'encadrement des éleveurs.

La valeur agronomique et économique des légumineuses fourragères au Maroc a été soulignée par plusieurs auteurs. Elles améliorent la fertilité et la structure du sol, et engendrent une bonne production animale riche en protéines en augmentant le rendement des cultures suivantes dans les systèmes de rotation. Toutefois, la gamme des espèces cultivées au Maroc reste limitée essentiellement à la luzerne (*Medicago sativa*), au bersim (*Trifolium alexandrinum* L.) et, à très petite échelle à la vesce (*Vicia spp.*), au pois (*Pisum arvense*) et au lupin (*Lupinus albus* et *Lupinus luteus*). Cependant dans quelques régions, la culture de la luzerne est limitée par l'hydromorphie du sol (Gharb, Loukkos), dans d'autres, celle du bersim par la salinité (Souss-massa) (Ben Khaled *et al.*, 2003). La recherche de nouvelles espèces fourragères, à travers la collecte, l'évaluation et la domestication des ressources génétiques locales s'imposent donc comme un préalable au développement de nouvelles cultures fourragères. Parmi ces dernières on note les légumineuses annuelles. Leur capacité de se ressemer naturellement d'une année à l'autre, permet de préserver un stock de semences dans le sol, grâce à un taux important de graines dures. Cette qualité permet d'obtenir une installation pérenne, spécialement adaptée aux aléas climatiques des zones méditerranéennes. D'autre part, l'intérêt des légumineuses annuelles envers les pérennes est d'éviter la compétition avec les autres cultures en raison de leur maturité précoce et de la disparition des organes végétatifs en été. Les contraintes qui pèsent sur la production fourragère sont nombreuses à savoir : l'irrégularité de la disponibilité des semences de qualité, leur prix élevé, et le manque de matériel végétal adapté à des contraintes spécifiques telle que la salinité. Cette dernière constitue un facteur qui limite la production des légumineuses fourragères en particulier dans les zones arides et semi-arides. La salinisation enregistrée dans ces zones résulte de la forte évaporation d'eau à partir du sol et d'une pluviométrie irrégulière et insuffisante. Cette salinisation provient aussi de l'irrigation le plus souvent mal contrôlée (Cherkaoui *et al.*, 2007).

Ainsi, la présente étude –subdivisée en quatre chapitres– vise à sélectionner les cultivars tolérants et productifs de certaines légumineuses fourragères annuelles locales sous conditions salines.

Le premier chapitre propose une synthèse bibliographique sur l'état des connaissances des légumineuses fourragères annuelles et les principales espèces cultivées vis-à-vis de la salinité et les systèmes de tolérance développés par ces plantes.

Le deuxième chapitre a pour objectifs la quantification de la diversité au sein d'une collection marocaine d'écotypes de diverses origines géographiques, appartenant à 11 espèces de trèfle (*Trifolium* spp.) et de lotier (*Lotus* spp.) annuelles, leur évaluation agromorphologique et l'identification des meilleurs écotypes en se basant particulièrement sur leur productivité et précocité.

Le troisième chapitre est consacré à la caractérisation sous serre de l'effet du stress salin sur les potentialités germinatives d'écotypes présélectionnés (Chapitre 2), ainsi que la recherche d'éventuelles corrélations pouvant lier le comportement au stade germination à celui de stades ultérieurs, et qui pourraient constituer un test rapide à cet égard. Ensuite proposer un modèle de la germination des légumineuses annuelles pastorales à graines dures dans des environnements salins. Comme il vise le suivi sous serre d'écotypes présélectionnés sur la base de leur germination et l'identification de leur réponses morpho-physiologiques à la salinité.

Le quatrième chapitre a pour objectif d'une part l'appréciation de l'interaction écotype-milieu afin de sélectionner les écotypes pouvant s'accommoder le mieux des eaux saumâtres et qui pourraient constituer un matériel végétal alternatif pour les zones marginales ou dégradées. Et d'autre part l'étude de leur composition chimique en phytoestrogènes notamment les coumestanes et les polyphénols.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les légumineuses fourragères annuelles

1. Importance des légumineuses fourragères annuelles

Les particularités qui confèrent aux légumineuses annuelles une importance du point de vue agricole et écologique sont leur persistance et leur productivité. Leur aptitude à fixer l'azote leur permet d'exprimer leur potentiel de croissance, même dans les sols pauvres en cet élément. L'intérêt des légumineuses annuelles envers les pérennes est d'éviter la compétition avec les autres cultures en raison de leur maturité précoce et de la disparition des organes végétatifs en été, ce qui est important en milieu méditerranéen.

1.1 Rôle des légumineuses fourragères dans les systèmes intégrés culture / pâturage

Le rôle des légumineuses annuelles dans les systèmes intégrés de rotation a été largement passé en revue en ce qui concerne les zones à climat méditerranéen d'Afrique du Nord, du Proche-Orient (Gaddes *et al.*, 2000) et d'Australie occidentale (Del Pozo *et al.*, 2000). Dans le contexte actuel, il est important de noter que de tels systèmes intégrés sont applicables aux zones recevant plus de 250-300 mm de pluie. Dans ces conditions, les légumineuses sont utilisées en vue d'améliorer la productivité là où les systèmes naturels ont été détruits par des façons culturales répétées (monoculture). Utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture, les légumineuses apportent une certaine contribution en azote, en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique. Les résidus des légumineuses sont plus riches en azote et contribuent à enrichir le sol en cet élément. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent aussi bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'entremise des résidus laissés par la légumineuse.

1.2 Procédure de réhabilitation impliquant les légumineuses annuelles

Les légumineuses annuelles présentent des caractéristiques qui permettraient leur utilisation dans les programmes de restauration et de réhabilitation des écosystèmes dégradés. Dans la plupart des cas, la présence de légumineuses annuelles complètera la performance des plantes associées, en constituant une source de biomasse ou d'azote, à une période différente de l'année. D'autre part, elles se caractérisent par leur persistance à long terme dans les écosystèmes méditerranéens à faible pluviométrie (Barbetti *et al.*, 2007). Les légumineuses fourragères sont une source importante de protéines pour l'alimentation des animaux, soit sous forme de foin ou bien consommées dans les prairies ou les parcours. Elles sont à la base

de la production de lait et de viande. Elles fournissent au cheptel une part importante de protéines nécessaires à leur croissance, de la Bétacarotène et des fibres indispensables à la digestion chez le ruminant.

2. Situation des légumineuses fourragères au Maroc (Historique)

Les travaux de recherche sur les légumineuses fourragères annuelles au Maroc sont très anciens. Plus particulièrement ceux réalisés à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA). Mais c'est surtout au début des années 80, avec l'opération du ley-farming et l'appui de Coopération Technique Allemande (GTZ) que plusieurs auteurs ont travaillé sur les légumineuses annuelles auto-régénératrices ; *Médicago* spp. annuels et le trèfle sous terrain (Jaritz, 1990 ; Matthaus, 1990 ; Cremer-Bach, 1992 ; Bounejmate, 1995 ; Sadiki *et al.*, 2005). Ces travaux ont concerné plusieurs aspects dont le choix d'espèces et de variétés adaptées introduites d'Australie et la sélection d'écotypes locaux de certaines légumineuses annuelles selon les besoins (type du sol, système de rotation ley-farming...etc.).

La flore marocaine est extrêmement riche en diverses espèces spontanées souvent consommées par les animaux, mais dont la valeur fourragère est encore mal connue (Birouk et Rejdali, 2002). La grande variation des conditions du milieu fait que pour chaque espèce, il existe un grand nombre d'écotypes dont la variabilité génétique constitue un matériel de choix pour la sélection et la création de variétés adaptées aux conditions diverses. Bien que les légumineuses annuelles croissent sous une grande diversité de conditions climatiques, l'attention se porte à présent sur l'appréciation de leurs performances et de leurs potentialités dans les écosystèmes méditerranéens sous faibles précipitations, c'est à dire les régions recevant en moyenne moins de 400 mm de pluie par an. De là découle l'intérêt de tirer profit de l'expérience acquise dans d'autres régions à climat méditerranéen, particulièrement en Australie en matière de légumineuses annuelles.

3. Situation des légumineuses fourragères en Australie (Historique)

L'Australie est considérée comme le pays à climat méditerranéen qui a le plus développé les légumineuses fourragères annuelles depuis les années 1930 (Berger *et al.*, 2002). Ce qui fait de lui un bon exemple à étudier. En combinaison avec l'utilisation de superphosphate, ce type de légumineuses ont conduit à la fertilité des sols du Sud et Ouest de ce pays, avec une plus grande production animale, une augmentation des rendements agricoles et la capacité de briser les cycles de vie des ravageurs lorsqu'elles sont cultivées dans un système de rotation (Lloyd *et al.*, 1991). Le système ley-farming qui consiste à semer une légumineuse auto-

régénératrice la première année et continuer à l'exploiter tous les deux ans en alternance avec une céréale, a été le système de rotation adopté (De Torres, 2012). Ainsi, la phase de pâturage est tributaire de l'auto-régénération des légumineuses annuelles à partir de graines dures qui restent en dormance pendant une période culturale d'un ou deux ans.

Les espèces qui ont été développées sont le trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum* L.) et des médics annuelles (*Medicago* spp.). Parmi d'autres espèces commerciales à cultivars enregistrés on note : *Ornithopus compressus* L., *Trifolium michelianum*, *T. resupinatum* L., *T. hirtum*. et *T. cherleri* L. Des études sur le comportement de *Trifolium michelianum* vis-à-vis de la salinité et l'engorgement du sol ont fini par la création de la variété Paradana (Craig et Beale, 1995). Par ailleurs, des travaux récents se sont concentrés sur la sélection des variétés à cycle végétatif court. De ce fait le Maroc fait partie des pays ciblés par l'Australie pour la collecte et la sélection des variétés qui répondent à ces caractéristiques, car il est connu par sa diversité spécifique vu la présence de zones à courte saison et à basse altitude avec de faibles précipitations annuelles (Pengelly *et al.*, 2006).

4. Légumineuses fourragères : le trèfle et le lotier

Les légumineuses fourragères annuelles dont s'intéresse la présente étude appartiennent au règne des trèfles et des lotiers. Ce choix est basé sur plusieurs raisons telles qu'en Méditerranée, le trèfle (*Trifolium*) fait parti du fourrage le plus important. Au moins une douzaine d'espèces appartenant à ce genre sont utilisées comme fourrage (Malaviya *et al.*, 2008). La qualité des trèfles est généralement supérieure à celle des graminées fourragères. Ils sont digérés plus rapidement que les graminées, reconnus pour leur haute teneur en protéines nutritives et de nombreux minéraux et de vitamines, leur résistance au piétinement des animaux comme ils peuvent également fixer l'azote d'une façon importante. Leur présence dans un pâturage améliore l'appétence du fourrage, ce qui augmentera la qualité du fourrage de l'animal qui les consomme ainsi que la production laitière (Arambarri, 2000). Les trèfles sont connus par leur adaptation aux différents types de sol. Plusieurs espèces de trèfles sont reconnues comme amélioratrices de la fertilité du sol comme le trèfle de Perse (*Trifolium resupinatum*). Il est utilisé en rotation et aussi en situation où l'irrigation pérenne n'est pas disponible pour la luzerne tant qu'il est récolté à temps pour semer les cultures d'été (Uranbey *et al.*, 2005). Les trèfles assurent l'augmentation du rendement. Des recherches ont montré que la fétuque élevée cultivé avec le trèfle blanc produisent plus de fourrage que les pâturages de fétuque élevée fertilisé avec de l'azote (Smith, 2004). Les trèfles sont communément

plantés avec le dactyle, ray-grass, ou fétuque élevée et la majorité des espèces tolèrent le pâturage intensif.

A leur tour les lotiers (*Lotus*) ont une très bonne croissance et sont reconnues comme amélioratrices de la fertilité du sol. Ils possèdent une très grande souplesse d'adaptation aux stress biotiques et abiotiques et aux conditions (du terrain ou du climat) les plus diverses et les plus dures : acidité, terres superficielles, sols battants, sols salins, mauvaise fertilisation et sécheresse (Teakle *et al.*, 2006). Le lotier possède en outre une très bonne qualité avec un fourrage relativement facile à faner, et il est intéressant pour l'implantation de certaines prairies temporaires en association avec le dactyle ou la fétuque élevée. Le lotier associé à ces mêmes graminées devient précieux pour l'amélioration de très nombreux parcours en pâturages de longue durée. Le lotier est une légumineuse qui persiste bien sur les sols mal drainés et au pH plus bas où la luzerne n'est pas adaptée à titre d'exemple.

5. Botanique et biologie

5.1 Taxonomie et aire géographique

Les trèfles et les lotiers appartiennent à la famille des *Fabaceae* et la sous famille des *Faboideae*. *Trifolium* fait partie de la tribu des *Trifolieae* et *Lotus* à celle des *Loteae*.

Le genre *Trifolium* est assez vaste, contenant quelques 237 espèces, dont 110 ont leur centre de diversité dans le Bassin Méditerranéen (Ellison *et al.*, 2006). Au Maroc on trouve 53 espèces dont quatre endémiques (Fennane *et al.*, 2007). Le genre *Trifolium* a une large répartition. Il s'étend dans les régions tempérées et subtropicales (Bulinska-Radomska, 2000), avec la plus grande diversité d'espèces dans les régions géographiques suivantes : l'Amérique du Nord occidentale et l'Afrique du Nord. Les espèces de trèfle se produisent sur un large éventail d'habitats : prairies, forêts, zones semi arides et montagnes. Différents botanistes ont mené un certain nombre d'expéditions de collecte en Europe orientale et dans les régions méditerranéennes (Taylor et Smith, 1990 ; Jürgen *et al.*, 2010). Toutefois la collection de matériel génétique s'est concentrée sur 10 à 20 espèces à importance agronomique, avec peu d'effort à préserver la vaste gamme d'espèces appartenant à ce genre (Malaviya *et al.*, 2008).

Le genre *Lotus* comprend environ 100 espèces annuelles et vivaces qui sont largement distribuées (Arambarri, 2000). Le centre principal de spéciation est la région méditerranéenne et s'étendant jusqu'à l'Afrique orientale et l'Afrique du Sud, l'Asie et l'Australie. Les espèces appartenant au genre *Lotus* sont adaptées à un large éventail d'habitats. Elles sont

généralement adaptées aux sols peu fertiles dont certaines (*Lotus tenuis* ; *Lotus creticus*, *Lotus glaber*) peuvent se développer dans des conditions stressantes, tels que des sols salins, acides ou engorgés d'eau (Teakle *et al.*, 2006 ; Sannazzaro *et al.*, 2006 ; Valiente *et al.*, 2007). Différentes espèces de *Lotus* sont actuellement utilisées pour améliorer les pâturages et la qualité du foin où d'autres espèces légumineuses fourragères ne sont pas adaptées (Papadopoulous et Kelman, 1999). *Lotus corniculatus* est sans doute l'espèce considérée comme ayant la plus grande importance agricole et la distribution la plus large (Díaz *et al.*, 2005a). On a montré que les populations autochtones des espèces sont caractérisées par une variabilité morphologique élevée en raison de la sélection naturelle du site d'habitat (Steiner et Garcia De Los Santos, 2001). Au Maroc 27 espèces ont été citées dont 9 endémiques (Fennane *et al.*, 2007). Les espèces rencontrées dans une collecte effectuée par l'INRA et qui seront traitées dans cette étude sont : *Trifolium arvense* L., *Trifolium bocconeii* Savi, *Trifolium campestre* Schreb, *Trifolium cherleri* L., *Trifolium glomeratum* L., *Trifolium isthmocarpum* Brot., *Trifolium lappaceum* L., *Trifolium resupinatum* L., *Trifolium scabrum* L., *Trifolium stellatum* L., *Trifolium tomentosum* L. et *Lotus ornithopodioides* L. (Figure 1).

5.2 Morphologie

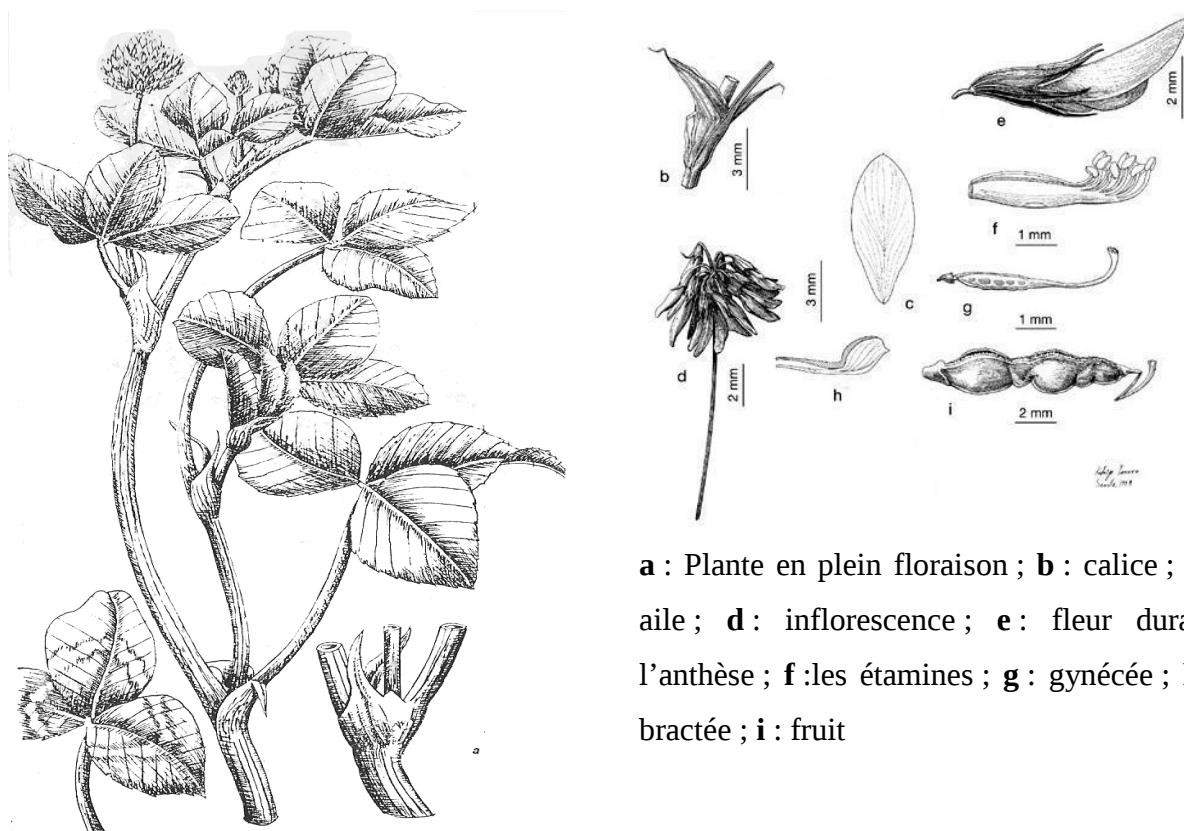
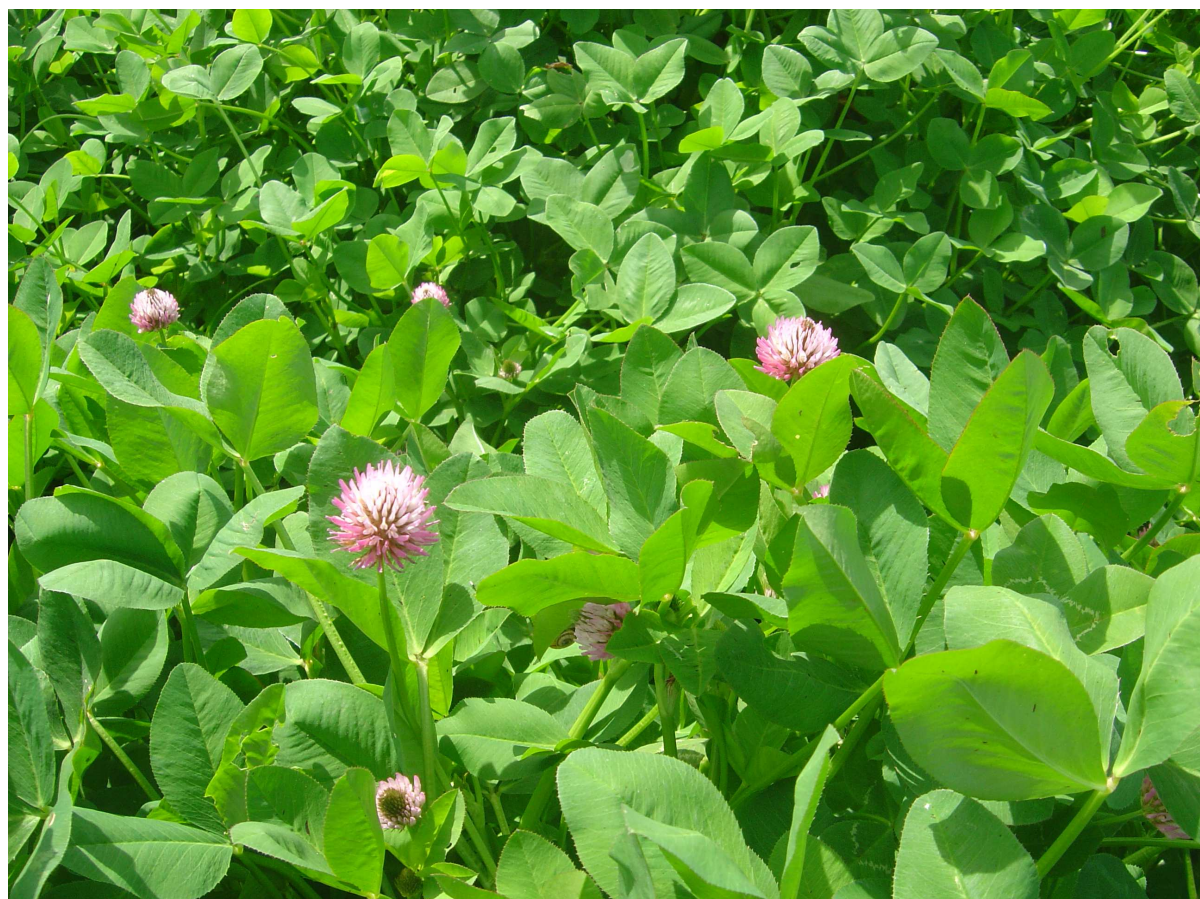
Les espèces citées se distinguent par leur taille ainsi que d'autres caractéristiques liées au port, tiges, feuilles, inflorescences et graines. Les principales caractéristiques sont réunies dans le tableau 1.

Tableau 1. Comparaison des principales caractéristiques morphologiques des espèces étudiées (Heller et Zohary, 1984)

	Tiges	Hauteur	Feuilles	Folioles	Inflorescence	Graines
<i>T. arvense</i>	Minces, dressées et rameuses	5-30 cm	Alternes, les supérieures sont sessiles	Linéaires, oblongues, à peine dentées au sommet	Racème capituliforme oblongue-cylindrique plus ou moins longuement pédonculée	Une graine par gousse, 0,8 mm
<i>T. bocconeii</i>	Pubescentes, dressées ou ascendantes	10-25 cm	Les supérieures sont à long pétiole, sessiles	Moins de 1 cm, oblongues en coin, denticulées au sommet, à nervures latérales non arquées en dehors	4-9 mm de diamètre	Petite ovoïde, 0,8 mm
<i>T. campestre</i>	Erigées, dressées, prostrés et ramifiées	10-30 cm	Peu nombreuses et alternes, pétiolées, avec des stipules ovales, légèrement renflées, à extrémité pointue	Ovales à base rétrécie. Finement dentées, 0,8-1,6 x 0,4-0,8 cm	Globuleuse, 0,8-1,4 cm de diamètre	Une seule graine par gousse, ovoïde, lenticulaire, 1 mm
<i>T. cherleri</i>	Sillonnées, ascendantes ou couchées	5-25 cm	Pétiole long, sauf les feuilles supérieures qui sont souvent subsessiles, ovales - oblongues	Ovales, cunéiformes 0,6 -1,2 x 0,4-0,8 cm	0,8-1,2 cm de diamètre	2 mm
<i>T. glomeratum</i>	Couchées ou ascendantes	10-30 cm	Alternes, pétiolées, sauf les supérieures qui sont opposées et subsessiles, nervures longitudinales	Obovales en coin, fortement nervées, denticulées jusque près de la base 0,6-1,5 x 0,4-1 cm	Racème capituliforme sessile, subsphérique, de 8 à 12 mm de diamètre	Réniforme, tuberculée, environ 1 mm,

<i>T. isthmocarpum</i> <i>T. lannaceu</i> <i>T. michelianum</i> <i>T. resupinatum</i> <i>T. scabrum</i>	Nombreuses, dressées ou ascendantes rarement couchées	30-80 cm	Longs pétioles, celles supérieures sont subsessiles	Largement elliptiques à obovales, arrondies à l'apex, denticulées, souvent pourvues d'une tache plus claire en forme de « v » 1-3,5 x 0,5-2 cm	Assez longuement pédonculée et les pédoncules plus longs que les feuilles 1,5-2,5 cm de diamètre	Petite irrégulièrement globuleuse, environ 1,2 mm
	Couchées, dressées, grêles, ramifiées	10-40 cm	Les inférieures alternes, pétiolées, les supérieures opposées, subsessiles	Obovales, denticulées au sommet 0,5-1,5 x 0,3-0,8 cm	Globuleuse, dense 0,8-1,5 cm de diamètre	Globuleuse, une graine par gousse 2 mm,
	Prostrées, dressées ou ascendantes	30-60 cm	Long pétiole sauf pour les feuilles supérieures; lancéolées triangulaires	Obovales à losangiques ou triangulaires 0,5-4 x 0,3-1,5 cm,	Globuleuse, 1-2 cm	Ovoïde, 2 mm
	Ascendantes, cylindriques assez grosses (diamètre 6-8 mm), glabres	40-60 cm	Glabres, longuement pétiolées,	Presque sessiles, ovales, denticulées, glabres ; 1-2,5 cm de long	Assez longuement pédonculée, globuleuse, 0,7-1 cm de diamètre	Ovoïde, environ 1,2 mm
	Étalées à dressées, flexueuses	8-30 cm	Alternes, pétiolées	Peu épaisses, ovales, denticulées, à nervures secondaires saillantes, arquées et épaissies à leur extrémité	Racème capituliforme globuleuse, sessile, de 5 à 12 mm de diamètre	Une seule graine par gousse 0,9-1,2 mm

L. ornithopodi T. tomentosum T. stellatum	Ascendantes ou érigées	5 à 25 cm	Alternes, longuement pétiolées, à grandes stipules	Les trois petites folioles sont en forme de cœur inversé, à extrémité légèrement dentée, à nervures nettes	Globuleuse, sphérique	0,8 mm
	Glabres, couchées, étalées	10-20 cm	Ovales finement nervées, denticulées glabres ou légèrement values en dessous	Obtriangulaire- cunéiforme 0,4 - 1,5 cm 0,4 -1,5 cm	Sessile, 6-8 mm de diamètre	Elliptique, paroi lisse brillante 0,8-1,1 mm,
	Ramifiées, pubescentes, dressées ou ascendantes	15-40 cm	Obovales ou losangiques	Larges, rhomboïdales en coin 8-25 x 5-15 mm,	Ombelle simple, 10-50 mm de diamètre	2-3 mm



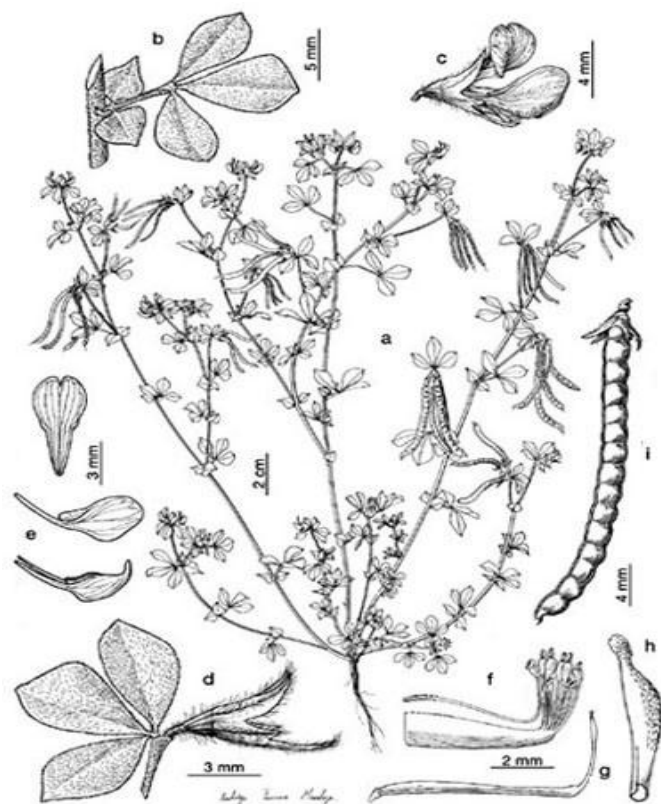
a : Plante en plein floraison ; **b** : calice ; **c** : aile ; **d** : inflorescence ; **e** : fleur durant l'anthèse ; **f** : les étamines ; **g** : gynécée ; **h** : bractée ; **i** : fruit

Figure 1. Caractéristiques des feuille, fleur et fruit de *Trifolium isthmocarpum* Brot (Heller et Zohary, 1984) (photo prise de l'essai dans la station de Guich INRA de Rabat)



a : Plante en plein floraison ; **b** : fleur durant l'anthèse ; **c** : aile ; **d** : calice ; **e** : bractée ; **f** : fruit

Figure 1 (suite). Caractéristiques des feuille, fleur et fruit de *Trifolium michelianum* Savi (Heller et Zohary, 1984) (photo prise de l'essai dans la station de Guich INRA de Rabat)



a : Plante en plein floraison ; **b** :
feuille ; **c** : fleur durant l'anthèse ;
d : calice et bractées ; **e** : ailes
f : étamines ; **g** : gynécée ; **h** : partie
supérieure du style ; **i** : fruit

Figure 1 (suite). Caractéristiques des feuille, fleur et fruit de *Lotus ornithopodioides*. L. (Heller et Zohary, 1984) (photo prise de l'essai dans la station de Guich INRA de Rabat)

6. Exigences édapho-climatiques et données écophysiological

Dans leur étude de la diversité des populations des légumineuses annuelles en relation avec les précipitations, Kenneth *et al.*, (2001) ont observé que le nombre d'espèces qui varie de 19 à 25 par site de collecte dans des régions bien arrosées, descend à 7 et même à 0, aux endroits moins arrosés. La température à son tour influe sur la répartition de ces légumineuses. Il a été démontré que les basses températures hivernales qui caractérisent les sites en altitude constituent les contraintes à l'expansion de *T. cherleri* en zone méditerranéenne (Ewing, 1999). Kalberer *et al.* (2006) travaillant sur *T. campestre* et *T. scabrum*, ont réussi à démontrer qu'il existe une relation positive entre leur capacité de survie à la gelée et le niveau d'exposition aux basses températures hivernales du site où elles ont été collectées.

Quant aux facteurs édaphiques, il est à savoir que le stress du sol peut agir soit directement sur une légumineuse, en influençant sa distribution, soit indirectement en influençant la distribution de ses *Rhizobium* symbiotes. Parmi ces facteurs édaphiques, on trouve le pH, le CaCO₃ et la texture du sol (proportions de sable, argile et limon), le statut nutritionnel du sol (particulièrement la teneur en phosphore et en potassium) et la salinité. La salinité est un stress que les légumineuses annuelles, en général, tolèrent peu. Toutefois, il existe des espèces du genre *Melilotus* spp., *Lotus* spp., *Trifolium* spp. et *Medicago* spp. qui ont été signalées comme ayant une tolérance à la salinité (Marañón, 1998, Yan *et al.*, 2000 ; Masters *et al.*, 2007). On note certaines études qui ont mis en évidence la capacité de *Mélilotus indicus* comme espèce alternative. Sa capacité de germination est réduite de 30 % seulement sur 300 mM NaCl (Rogers *et al.*, 2008 ; Al Sherif, 2009 ; Rogers *et al.*, 2011). Cependant son appétibilité est moins importante vu son goût amer justifié par la présence de la coumarine (Asres *et al.*, 2005). Cette dernière a été mentionnée par certains auteurs comme toxique à cause des hémorragies internes qu'elle provoque au cheptel (Suttie, 2000). Sa faible teneur en protéines digestibles ainsi que le taux élevé de graines dures ont été signalés (Julier et Huyghe, 2010). On déduit alors que plus la concentration saline du milieu augmente plus la qualité de la plante diminue.

D'autre part et étant donné qu'elle apparaît généralement dans les parties basses du profil, la salinisation est souvent associée aux zones temporairement inondées. Dans ce contexte, quelques légumineuses combinent une tolérance à la salinité avec une tolérance à

l'engorgement, telle que *Trifolium michelianum* et *Trifolium resupinatum* (Rogers et Noble, 1991).

7. Techniques de production

Les techniques culturales de ces légumineuses annuelles sont sensiblement identiques.

7.1 Place dans l'assolement et l'occupation du sol

Les espèces de la présente étude sont essentiellement pastorales, destinées pour des prairies permanentes et des parcours sur sites marginaux ou inaptes aux grandes cultures. Exceptionnellement, sur des sites relativement bien arables, elles peuvent être introduites en assolement, avec une rotation de trois à cinq ans de prairie, suivies de cultures pendant un à deux ans, tel que le cas spécial de ley farming. Comme elles fournissent moins de coupes et fleurissent très tôt au printemps, elles peuvent être cultivées comme cultures dérobées dans toutes les régions à bersim (Gharb, Haouz...) (Bounejmate, 1997a).

7.2 Installation

Le début de la période de semis est limité par la disponibilité en eau et la fin par des températures trop basses. Les semis effectués trop tôt et/ou en sol sec risquent d'échouer par déficit hydrique. Les semis trop tardifs comportent le risque d'une levée médiocre à cause du ralentissement de la germination, et davantage d'attaques de maladies cryptogamiques qui y sont associées. La période de semis « normale » se situe entre la fin d'octobre et la fin de novembre. Les semis de décembre réussissent rarement, dans les régions à hiver tempéré encore moins que dans les régions à hiver doux. La profondeur de semis varie normalement de 0,5 à 2,5 cm en fonction de la texture du sol et du poids de graines. En raison de la petitesse des graines de ces espèces, les doses recommandées par hectare sont faibles, variant de 15 à 25 kg/ha. Dans les prairies permanentes en zones bien arrosées, les mélanges de variétés peuvent inclure des graminées vivaces pour stabiliser la composition botanique (Bounejmate, 1997b ; Gallardo-Carrera, 2006).

7.3 Fertilisation

Selon la disponibilité de phosphore, la fertilisation de fond sera de 35 à 70 kg P_2O_5 /ha et sur des sols déficients en potasse de 40 kg K_2O /ha. Si le pH_{H_2O} est inférieur à 5,5 ; un

chaulage d'au moins 500 kg CaCO_3 /ha est indiqué pour augmenter la disponibilité de Mo et P et pour éviter des effets toxiques d'Al. La fertilisation d'entretien sera relativement réduite compte tenu des faibles exportations par pâturage continu, soit 25 à 35 kg P_2O_5 /ha. Les prairies à base des légumineuses annuelles citées n'exigent pas de fertilisation azotée. Néanmoins un apport d'azote à faible dose jusqu'à 30 kg /ha peut être justifié dans l'année d'installation (Jaritz, 1992).

7.4 Exploitation et entretien

Les légumineuses annuelles de la présente étude peuvent être utilisées comme fourrage à faucher au fur et à mesure des besoins. En plus, elles peuvent être semées pour la création de prairies temporaires ou permanentes pâturées (Ewing, 1999). Un pâturage précoce permet un rendement supérieur en graines et donc une meilleure persistance, un meilleur contrôle des mauvaises herbes et une production printanière élevée en matière sèche. L'objectif de la gestion des prairies à trèfle en année d'installation est d'avoir un peuplement qui produit suffisamment de semences pour permettre une bonne régénération en 2^{ème} année et non de produire et d'exploiter le maximum de matière sèche possible. Le pâturage doit être réduit ou arrêté pendant la floraison (Jaritz, 1997). Le pâturage estival est moins critique que chez d'autres légumineuses annuelles plus dominantes au Maroc telles que les prairies à *Medicago* spp. en raison de la protection des gousses par enfouissement dans le sol, qui varie toutefois selon la variété (Rochon *et al.*, 2004). Néanmoins, la capacité d'enfouissement des capitules des variétés précoces est supérieure à celle des variétés tardives. L'herbe sèche doit être largement consommée en été pour faciliter la germination après les premières pluies d'automne.

7.5 Maladies et parasites

On connaît très peu l'importance des maladies et des parasites du trèfle au Maroc. Des maladies racinaires (*Fusarium* spp., *Phythium* spp.) souvent répandues dans des régions pluvieuses, ont été observées sur certaines zones de Larache où *Trifolium subterraneum* a été cultivé (Jaritz, 1997). Parmi les maladies importantes identifiées sur *Trifolium alexandrinum* on cite l'Anthracnose du Trèfle (*Kabatiella caulivora*). Cependant, *T. resupinatum* se distingue par sa résistance à ses attaques. A savoir lorsque *Trifolium alexandrinum* est fortement attaqué par cette maladie cryptogamique, *T. resupinatum* n'est ordinairement pas touché (Bayliss *et al.*, 2001). Autre exemple à citer est Red leaf, un virus qui affecte *Trifolium*

subterraneum et *Trifolium alexandrium*. Ce virus est répandu le long du littoral avec une intensité d'attaque très variable d'une année à l'autre (Jaritz, 1997).

7.6 Symbiose

Dans le cas de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse, la fixation de l'azote atmosphérique se réalise dans les nodosités, en conditions d'anaérobiose, et en présence de leg-hémoglobine qui permet un faible apport de dioxygène. Les bactéries du genre *Rhizobium* sont des bactéries Gram⁻, qui peuvent se déplacer, et infecter les racines des légumineuses en entraînant la formation de nodules dans lesquels elles trouvent un micro habitat très favorable (Arcondeguy *et al.*, 1997; Giraud, 2007).

La capacité de fixation d'azote de légumineuses annuelles en symbiose avec les bactéries nodulantes des racines est essentielle pour faire d'elles un élément productif. Il est bien évident qu'en fixant l'azote pour subvenir à leur besoins propres, les légumineuses en procurent également aux plantes qui leurs sont associées dans les écosystèmes (Greenland, 1991).

L'une des caractéristiques majeures des associations *Rhizobium*-légumineuse est leur spécificité d'hôte. En effet, une espèce de *Rhizobium* donnée n'est capable, en général, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux. De même une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces de *Rhizobium* (Tilak *et al.*, 2005). L'espèce *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* est l'une des espèces les plus exploitées comme bactérie nodulante des trèfles cultivées. Cependant, il est rare qu'une seule souche de *R. leguminosarum bv. trifolii* puisse effectivement fixer l'azote à travers une grande diversité de trèfles, en particulier ceux de différents horizons géographiques et phénologiques (Reeve *et al.*, 2010). Plusieurs études ont rapporté l'importante incompatibilité souche-hôte entre le microsymbionte *R. leguminosarum bv. trifolii* et *Trifolium* spp (Yates *et al.*, 2008 ; Janczarek *et al.*, 2010).

Quant au genre *Lotus*, il est nodulé par *Rhizobium loti* et *Bradyrhizobium* sp (Barrientos *et al.*, 2002) ainsi que certaines espèces de *Mesorhizobium* (Estrella *et al.*, 2009). A titre d'exemple *Lotus japonicus* qui forme des nodules fonctionnels avec la souche *Rhizobium* sp. NGR234 et *R. etli* (Schumpp, 2009).

7.7 Composition chimique, valeur alimentaire et productivité

Les espèces de la présente étude produisent pour la majorité un fourrage riche en protéines, pauvres en cellulose brute, avec des valeurs énergétiques et azotées élevées, de l'ordre de 0,84 UF/kg MS chez *T. resupinatum* par exemple (Tableau 2). Elles diffèrent

notamment par leur teneur en glucides qui varie de 6 à 16% (Owens *et al.*, 2000 ; McAllister, 2005).

Tableau 2. Valeur énergétique (UF/kg MS) et Composition chimique selon les saisons (en % M.S.) chez quelques légumineuses annuelles (d'après Genin, 1990 ; Emile et Traineau, 1991 ; Jaritz, 1997). MAD : matières azotées digestibles ; MAT: matières azotées totales, NDF : constituants pariétaux, ADF : lignocellulose, et MM : matières minérales.

		MAD	MAT	NDF	ADF	MM	UF/kg MS
<i>Trifolium resupinatum</i> L.	1 ^{er} cycle	176	13,4	35,7	29,7	8	0,84
	2 ^{ème} cycle	135	8,5	35,5	33,7	8	0,77
	3 ^{ème} cycle	146	5,4	49,6	41	8,2	0,76
<i>Trifolium subterraneum</i> L.	1 ^{er} cycle	81	14,9	35,7	28,6	9,4	1,05
	2 ^{ème} cycle	70	12,7	35,5	33,7	9	1,01
	3 ^{ème} cycle	79	6,3	49,6	42	8,8	1
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	1 ^{er} cycle	146	20	46,9	21,4	11,7	0,83
	2 ^{ème} cycle	235	20,9	55,1	25,4	14,2	0,86
	3 ^{ème} cycle	129	18,4	55,7	28,8	11,3	0,73
<i>Lotus scoparius</i> L.	1 ^{er} cycle	182	15	43,7	32,9	4,8	0,87
	2 ^{ème} cycle	197	11	44,6	34,6	4,2	0,89
	3 ^{ème} cycle	189	6,8	57,3	44,8	2,8	0,86

La discussion sur la variabilité de la productivité est étroitement reliée à la productivité de l'écosystème duquel relève la légumineuse annuelle. En effet, les légumineuses annuelles croissent rarement en peuplement monospécifique mais sont plus communément accompagnés, dans les pâturages, par des graminées et autres herbacées (Waters *et al.*, 2001). Sous des conditions optimales, en zones méditerranéennes, les pâturages dominés par des légumineuses annuelles sont capables d'accumuler de la matière sèche à des taux supérieurs à 150 kg / ha /jour (Norman *et al.*, 2005).

7.8 Pouvoir de résilience des légumineuses annuelles

Le succès des légumineuses annuelles dépend de leur aptitude à produire des graines et à les amener jusqu'à la production effective de populations végétales durant les saisons suivantes de croissance. Le stock de semences des légumineuses annuelles suit un cycle annuel. Ce stock atteint son niveau le plus bas en hiver suite à la germination. De nouvelles graines s'ajoutent au stock chaque printemps, saison durant laquelle le pic annuel est atteint. Il s'ensuit une diminution qui résulte de la consommation des graines par les animaux, puis de la germination d'une proportion du reste des graines. Cependant, il est important de noter que certaines graines subsistent dans le sol durant toute la période de croissance hivernale, sans germer (Van Assche *et al.*, 2003). La production grainière est également vitale pour assurer la

pérennité de l'espèce. Le potentiel de production grainière de certaines légumineuses annuelles (*T. resupinatum*) dans les pâtures où elles dominent, est généralement estimé de 1 à 2 kg de graines/mm de pluie (Bounejmate, 1997a). Les plantes qui sacrifient une haute productivité printanière de biomasse verte pour accroître la production grainière et par conséquent leur persistance, sont probablement avantagées dans un écosystème sous pluviométrie faible. Le développement d'un tégument imperméable (graines dures) est le dispositif par lequel le stock de graines est habituellement préservé pour de longues périodes (souvent au-delà de cinq ans) (Benvenuti *et al.*, 2005 ; Cristaudo *et al.* 2010). Malgré des variations considérables, les études montrent que chez de nombreuses légumineuses, particulièrement celles des régions sous faible pluviométrie, moins de 20% de la production grainière d'une année germent au cours de la saison de végétation qui suit (Zatout, 1995 ; Brown *et al.*, 2006). Des études, à long terme, sur le ramollissement des graines sont rares.

II. Les légumineuses fourragères annuelles et la salinité

Plusieurs contraintes environnementales sont limitantes pour la croissance et le développement des légumineuses fourragères. La salinité est considérée comme un facteur majeur influant l'agriculture dans les zones arides et semi arides. Approximativement 40 % des surfaces sur terre sont caractérisés par la présence d'un problème potentiel de salinité (Hassani *et al.*, 2008).

1. Notion de la salinité

Le sel dans le langage courant, est le chlorure de sodium alors que dans la chimie un sel est le produit de la neutralisation d'un acide par une base (ou salification). De point de vue agronomique, la « salinité » d'un milieu correspond à une surcharge en sels minéraux de la solution du sol ou la solution nutritive (Flowers, 2004). La salinisation est le processus par lequel les sels s'accumulent dans le sol. Ces sels sont représentés en grande partie par des cations (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} et K^+) et des anions (Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} et NO_3^-).

1.1 Salinisation du sol

Par définition, un sol salin est un sol qui contient des concentrations suffisamment élevées de sel hydrosolubles, notamment le sulfate de sodium (Na_2SO_4), le calcium, le magnésium et le chlore sous forme ionique : Ca^{2+} , Mg^{2+} et Cl^- . Par le processus naturel de salinisation (processus par lequel les sels s'accumulent dans le sol) ces sels peuvent se concentrer à la surface du sol et y causer un état appelé salinité du sol (Antipolis, 2003). Une valeur élevée de

la salinité signifie une grande quantité d'ions en solution, ce qui rend plus difficile l'absorption de l'eau et des éléments minéraux par la plante. Une salinité trop élevée peut causer des brûlures racinaires.

1.2 Salinisation des eaux d'irrigation

La qualité d'eau d'irrigation est un facteur important à prendre en considération dans l'agriculture en irrigué car elle constitue la première source de sels solubles. La salinité peut se mesurer de deux façons, soit par les matières dissoutes totales (MDT) exprimé en mg/l ou, plus couramment, par la conductivité électrique. Cette dernière est exprimée en millisiemens/centimètre (mS/cm) (Couture, 2004).

2. Situation au Maroc

Le Maroc n'échappe pas à la salinisation des sols et des eaux d'irrigation à cause du climat aride qui régit dans la majeure partie du territoire, la longueur des zones côtières et la faible profondeur des nappes phréatiques. Ces dernières alimentées par des châteaux d'eau où existent d'importantes masses rocheuses salées ou gypseuses, notamment au Rif et dans l'Atlas (Hsissou, 2002). Par conséquent, ce problème commence à prendre de l'ampleur dans la majorité des périmètres irrigués dans les régions arides et pré-sahariennes (Debbarh et Badraoui, 2002), sans négliger les régions littorales (de Safi à Tanger) avec l'avancée du front marin et le surpompage. A savoir que plus de 38 % des sols dans les principaux périmètres irrigués sont affectés par la salinité (Aït Haddou *et al.*, 2004). En effet, l'irrigation a constitué une voie privilégiée du développement agricole et a bénéficié d'une attention particulière des pouvoirs publics (Tableau 3). Toutefois, la mise en valeur intensive sous irrigation dans les zones arides et semi-arides conduit le plus souvent à la dégradation de la qualité des ressources en sol et en eau. L'ampleur de la dégradation est fortement liée à la qualité de l'eau d'irrigation, à la non maîtrise de la trilogie : Irrigation-Salinité-Drainage et aux pratiques de mise en valeur agricole non rationnelles. On note également la salinisation des eaux au contact de formations salifères et l'usage des eaux salées de nappe pour l'irrigation. Cette salinisation affecte les écoulements de surface et les nappes et consécutivement les sols irrigués, particulièrement, en cas de sécheresse. C'est le cas de quelques oueds (Oum er Rbia dans le Tadla, El Malh à Ouarzazate,...etc.) et surtout de nombreuses nappes : Haouz, Moulouya, Ouarzazate, Souss Massa, Tadla.

Tableau 3. Superficies (en ha) de certains périmètres irrigués du Maroc (Debbarh et Badraoui, 2002)

Périmètres	Superficie (ha)
Grande Hydraulique	671 700
Moulouya	77 280
Gharb	106 350
Doukkala	104 600
Haouz	142 620
Tadla	109 000
Tafilalet	27 950
Ouarzazate	37 600
Sous-Massa	39 900
Loukkos	26 400
Petit et Moyenne Hydraulique	332 300

En général le phénomène continue à s'aggraver. La concentration en sels augmente et les zones atteintes s'étendent au point où les neuf grands périmètres irrigués du Maroc sont touchés, à savoir les périmètres de Doukkala, Gharb, Haouz, Loukkos, Moulouya, Ouarzazate, Souss Massa, Tadla et Tafilalet. Dans plusieurs régions, les concentrations salines ont atteint des valeurs qui les rendent non appropriées à l'irrigation (Tableau 4).

Peu de plantes fourragères sont tolérantes à ces conditions, surtout pendant la période sèche et chaude de l'année où l'ETP est élevée, ce qui augmente la concentration de la solution du sol et par conséquent les forces osmotiques externes entraînant la mortalité des cultures (Benyahia *et al.*, 2004). Dans ces conditions deux démarches sont généralement envisagées pour améliorer les productions :

- Le dessalement des eaux ou l'accroissement du lessivage des sols par drainage (opérations très coûteuses, nécessitant des investissements importants).
- L'exploitation de la physiologie des plantes et de leur génétique de tolérance à la salinité, pour réaliser des programmes de sélection d'espèces et de variétés tolérantes au stress salin.

Tableau 4. Importance de la salinité d'eau d'irrigation dans certains périmètres irrigués du Maroc selon différentes études (Achheb *et al.*, 2001 ; Hsissou *et al.*, 2001; Lahlou *et al.*, 2002 ; Bannari *et al.*, 2008 ; Dakak *et al.*, 2013, Zouhri *et al.*, 2013)

Périmètre	Conductivité électrique (CE)
Bassin du Gharb (la zone côtière)	1500 dS/m
La Mamora	1,56 dS/m
Sud-ouest de la région de Souk El Arba	0,99 dS/m
Bassin du Sahel-Doukkala	entre 0,4 et 10 dS/m
Plaine de la Chaouia côtière	15,62 dS/m
Bassin du Souss-Massa	625 et 6027 μ S/cm
Plaine semi-aride du Tadla	0,35 et 23 dS/m

3. Paramètres affectés par la salinité

La salinité affecte presque tous les mécanismes physiologiques et biochimiques des plantes. De fortes concentrations de sel exogènes affectent la germination des graines, provoquent un déficit physiologique en eau et un déséquilibre ionique des cellules ainsi qu'un stress osmotique (Munns 2002 ; Hajlaoui *et al.*, 2007). Toutefois, la croissance des plantes est réduite par le stress salin selon le degré de tolérance à la salinité des espèces (Munns *et al.*, 1995).

3.1 Effet de la salinité sur la germination

Le chlorure de sodium présent dans le sol ou dans l'eau d'irrigation affecte la germination de deux manières, il diminue la vitesse de germination et réduit le pouvoir germinatif. Cet effet dépend de la nature de l'espèce et de l'intensité du stress salin (Ben Naceur *et al.*, 2001 ; Tobe *et al.*, 2001). La réduction du pouvoir germinatif est due à l'augmentation de la pression osmotique de la solution du sol, qui ralentit l'imbibition et limite l'absorption de l'eau nécessaire au déclenchement des processus métaboliques impliqués dans la germination. La salinité perturbe également les systèmes enzymatiques impliqués dans les différentes fonctions physiologiques de la graine en germination, tels que la diminution de l'activité de polyphénol oxydase et amylase (Khemiri *et al.*, 2004 ; Levent *et al.*, 2008) et des peroxydases (Amaya *et al.*, 1999). Pour les sols salins, les légumineuses fourragères annuelles recherchées sont celles à grande capacité de germination et d'installation des semis, du fait que ces processus doivent se refaire chaque année. A chaque formation de graines, il y a une proportion à forte dureté de tégument (imperméabilité). Certaines de ces graines dures vont s'adoucir (devenir perméables) sur la période été-automne et seront disponibles pour rétablir de nouvelles plantes, tandis que les graines dures restantes, forment une banque de semences qui vont s'adoucir plus ultérieurement.

3.2 Effet de la salinité sur le stade végétatif

La présence de sel dans les milieux de culture exerce divers effets sur la croissance des plantes et sur la qualité de la production. Ainsi elles peuvent manifester des formes adaptatives telles que le faible allongement des organes et de leurs ramifications, le raccourcissement des entre-nœuds et des tiges et la diminution de la surface foliaire. Cependant, certaines plantes à enracinement profond peuvent tolérer la salinité par l'extension de leurs racines vers les horizons les moins salés des sols (Hajlaoui *et al.*, 2007). Cet effet dépressif dépend de l'agressivité du stress, sa durée d'application et de l'âge des plantes. Mer

et al., (2000) ont constaté suite à leur étude de l'effet de salinité sur la légumineuse *Cicer arietinum* L. (pois chiche) que la réduction de croissance est négligeable pendant les six premiers jours et qu'elle devient importante à partir du 14^{ème} jour.

3.3 Effet sur la nodulation

Le stress salin réduit la nodulation des légumineuses en inhibant les événements symbiotiques. Les niveaux de salinité qui inhibent la symbiose entre les légumineuses et les *Rhizobium* sont différents de ceux qui inhibent la croissance des symbiotes individuels, ces derniers sont généralement plus tolérants à la salinité (Aydi *et al.*, 2004). En effet, la mauvaise performance symbiotique de certaines légumineuses dans des conditions salines n'est pas due à des limitations de sel sur la croissance des *Rhizobiums*. Etant donné que réussir une symbiose *Rhizobium*-légumineuse dans des environnements salins comprend : la colonisation et l'invasion des *Rhizobiums* de la rhizosphère, et la formation de nodules efficaces tolérants au sel (Zahran, 2000). La gamme de tolérance des *Rhizobiums* au sel est variable selon la souche et le type de sel. Certaines sont inhibées par une concentration de 100 mM de NaCl, alors que les plus tolérantes peuvent survivre à des concentrations -de cet élément- beaucoup plus élevées. Par exemple certaines souches de la bactérie *Sinorhizobium meliloti* sont tolérantes entre 300 et 700 mM NaCl (Bobik *et al.*, 2006), alors que d'autres de *Rhizobium leguminosarum* tolèrent des variations entre 150 mM NaCl (Unni et Rao, 2001) et 350 mM NaCl (Predeepa et Ravindran, 2010). Plusieurs souches ont été créées à partir de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. On cite ANU843 qui nodule particulièrement l'espèce vivace *T. repens* (Robledo *et al.*, 2008), la souche WSM2304 sur des trèfles annuels (Cornea *et al.*, 2011). Toutefois la souche WSM1325 est la souche la plus commercialisée et connue comme inoculant pour un large éventail de trèfles annuels d'origine méditerranéenne en raison de ses attributs de tolérance à la salinité (Reeve *et al.*, 2010). Certaines études ont rapporté sa tolérance en symbiose à des concentrations de 85 mM à 152 mM NaCl (Janczarek *et al.*, 2010). Pourtant et comme a été mentionné précédemment, il est rare qu'une seule souche puisse fixer l'azote à travers une grande diversité de trèfles vu les barrières géographiques et phénologiques. La symbiose *Rhizobium*-légumineuse dans les écosystèmes arides est importante. D'ailleurs, les légumineuses, qui sont généralement présentes dans les écosystèmes arides, peuvent être adaptées pour fixer plus de N₂ dans des conditions salines que celles cultivées dans d'autres habitats (Kyaw *et al.*, 2005).

Il est à signaler que le stress salin peut modifier la synthèse de certaines composantes cellulaires (protéines et lipopolysaccharides) des *Rhizobiums* (Martir *et al.*, 2007) ce qui peut se répercuter sur la production de la plante hôte elle-même. On peut citer le Tréhalose, un

disaccharide accumulé par de nombreux micro-organismes, et qui agit comme un protecteur pendant les périodes de stress physiologique, telle la salinité. Des études antérieures ont indiqué que les gènes de biosynthèse de Tréhalose (*otsA*, *Tre.s*, et *Tre.y*) dans *Bradyrhizobium japonicum* (nodule les racines de soja *Glycine max* L.) ont été induits par la salinité. Selon la même étude l'analyse des mutations fonctionnelles indique que la perturbation d'*otsA* diminue l'accumulation de tréhalose dans les cellules. Ainsi, les souches mutantes dépourvus du gène *otsA* fonctionnel n'ont pas réussi à se développer sur un milieu contenant 60 mM de NaCl. En conséquence, les plantes de soja inoculées avec des souches mutantes produisent moins de nodules matures et plus de nodules immatures par rapport à celles produites par la souche de type sauvage.

4. Résistance et survie à la salinité chez les légumineuses fourragères annuelles

La résistance à la salinité des plantes fourragères annuelles se définit comme étant l'aptitude à maintenir une croissance et un niveau de production relativement élevé à la fin de leur cycle végétatif. En effet, les effets de la salinité sur les végétaux peuvent être de nature :

- Osmotique : réduction de l'absorption d'eau par la plante suite à une pression osmotique élevée ;
- Toxique : transport et accumulation de quantités excessives de certains ions, notamment Na^+ dans les parties aériennes ;
- Nutritionnelle : déficience dans l'absorption de certains ions essentiels et plus particulièrement les ions K^+ et Ca^+ .

Ainsi, les plantes définies comme étant plus ou moins résistantes à la salinité, ont développé différents mécanismes pour leur survie et leur maintien sous des conditions salines. Leur capacité de s'acclimater au stress salin s'exprime par des modifications des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (Ben Khaled *et al.*, 2003).

5. Stratégies d'adaptations et mécanismes morphologiques de survie à la salinité

5.1 Réduction de la surface foliaire

Un stress salin sévère peut aboutir à un déficit hydrique. La réduction de la croissance foliaire, quand le stress salin est très important, est un mécanisme majeur de réductions des besoins en eau (Riccardi *et al.*, 2004). Ainsi, ce déficit hydrique se traduit par des changements progressifs dans la structure de la plante, qui visent à réduire sa surface foliaire. Durant la seconde partie du cycle végétatif, c'est par une sénescence accélérée des feuilles que la réduction de la taille s'opère. Par conséquent, on passe de la réduction de l'expansion

cellulaire, la réduction de la division cellulaire, l'enroulement des feuilles à la mort des feuilles (Gage, 2004). Zgallai *et al.* (2007) ont montré que l'enroulement des feuilles entraîne une diminution de 40 à 60 % de la transpiration. Ce phénomène intervient à des potentiels hydriques de -0,8 à -1,0 MPa.

En revanche, la régulation stomatique (fermeture des stomates) est liée à la diminution de la surface foliaire du fait que l'assimilation du carbone photosynthétique est sévèrement réduite. En effet, les composantes stomatiques reliées aux cycles du CO₂ sont affectés par les sels. Le contrôle des stomates a été attribué surtout à une phytohormone, l'acide abscissique (ABA), synthétisée par les racines soumises au stress et véhiculée jusqu'aux feuilles par la sève brute (Sibole *et al.*, 2003). Le rôle de la régulation stomatique au cours du stress hydrique suite à un stress salin est primordial en raison de son influence directe sur la photosynthèse, la transpiration et les pertes d'eau au niveau des feuilles (Loss et Siddique, 1994). Ainsi, cette grandeur (la régulation stomatique) pourrait donc apparaître comme un indicateur de stress salin si sa mesure était aisée.

5.2 Conductance stomatique

La conductance stomatique est l'inverse de la résistance stomatique et mesure le niveau de la transpiration de la feuille qui dépend du degré d'ouverture des stomates et du même jouer le rôle d'un indicateur au stress salin. Une baisse de la conductance stomatique est un indicateur précoce d'un stress subi par la plante (Ewert *et al.*, 2000). La fermeture stomatique est généralement déclenchée suite à une forte chute du potentiel de turgescence des cellules de garde par rapport à celui des cellules subsidaires (James *et al.*, 2002). La conductance stomatique varie en fonction des stades de développement de la plante. Elle diminue au fur et à mesure qu'on tend vers la fin du cycle. L'absence de possibilité de fermer les stomates dans des conditions salines a été proposée comme une raison importante de la sensibilité aux sols salins pour certaines plantes. Par exemple, *Aster tripolium* arrive à se développer dans des conditions salines, ce qui est attribué à sa capacité de fermer les stomates en présence de Na⁺ dans les l'apoplasme des feuilles. Alors que la sensibilité d'*Aster amellus* au sel a été attribuée à l'inhibition de la fermeture des stomates par Na⁺ (Tester et Davenport, 2003).

5.3 Succulence

La succulence est liée à la capacité de la plante de stocker de l'eau dans les feuilles, les tiges ou les racines. Les plantes tolérantes ont développé des moyens qui empêchent la perte d'eau, telles que la réduction de la surface, présence de poils...etc. Elle est souvent liée au

mécanisme de la dilution. Dans ce cas les feuilles s'épaississent par l'augmentation de la taille des cellules épidermiques et parenchymateuses et elles procèdent à la dilution des ions à l'intérieur des cellules afin d'éviter les concentrations nocives des sels (Lazrek, 2008).

6. Stratégies d'adaptations et mécanismes physiologiques de survie à la salinité

6.1 Homéostasie cellulaire

L'homéostasie (capacité que peut avoir la plante à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures) ionique au niveau des cellules est atteinte sous stress salin par les stratégies suivantes :

a) Exclusion des ions Na^+ des cellules par les canaux ioniques : anti-port Na^+/H^+ (généralement au niveau de l'assise extérieure des racines) ou bien par la limitation d'entrée des ions Na^+ . D'après Ozlem (2011) l'adaptation de certaines variétés de *Trifolium pratense* à la salinité est fréquemment associée à l'exclusion de l'ion chlorure. Tandis que Flowers et Hajibagheri (2001) lient cette adaptation à l'exclusion des deux ions sodium et chlorure.

b) Compartimentation de Na^+ dans des vacuoles intracellulaires pour un ajustement osmotique (Zhu, 2002). La compartimentation de Na^+ dans des vacuoles est une stratégie très importante chez les plantes permettant de maintenir ces ions à une faible concentration dans le cytoplasme et conserver un faible potentiel osmotique cellulaire. Certaines plantes ont développé ce mécanisme vu que l'exclusion de l'excès de Na^+ du cytoplasme est un processus coûteux en énergie pour la plante. Teakle *et al.* (2010) ont identifié dans leur étude de *Lotus tenuis* l'existence d'un gène (*LtNHX1*) codant pour anti-port Na^+/H^+ , permettant l'accumulation de Na^+ dans ses feuilles mais pas dans les graines. L'espèce s'est montrée ainsi tolérante au stress salin en conservant dans ces conditions de bonnes qualités de graines pour sa régénération.

6.2 Sélectivité des ions

La sélectivité est évoquée lorsque dans le même milieu, le contenu minéral dans les plantes varie d'une espèce à l'autre (Luo *et al.*, 2005). De Boer et Volkov (2003) ont révélé que la sélectivité chez *Trifolium repens* L. s'exerce principalement à l'entrée des ions dans la racine, c'est-à-dire au niveau du symplasme (désigne le continuum intracellulaire formé par les cellules végétales) des cellules corticales. Van Huylenbroeck *et al.* (1999) ont par exemple remarqué que les légumineuses accumulent moins de K^+ mais plus de Ca^{2+} que les graminées. Tandis que Teakle *et al.* (2006) ont établi une différence notable de sélectivité sous les mêmes conditions salines entre les deux légumineuses *Lotus tenuis* et *Lotus corniculatus*. *Lotus*

tenuis maintient une sélectivité de K^+ envers Na^+ après 4 semaines d'exposition au 200 mM de NaCl ; notamment les ratios de K^+/Na^+ chez les plantes de *L. tenuis* ont été le double de ceux calculés chez *L. corniculatus*. Généralement, le stress salin entraîne la diminution de ce ratio, du fait que les ions Na^+ entrent en concurrence avec les ions K^+ , ce qui est défavorable pour les processus biochimiques cellulaires. Dans ce sens, une forte concentration de K^+ augmente le potentiel osmotique qui entraîne une entrée d'eau à partir du milieu extérieur (Verslues *et al.*, 2006). En effet, Le maintien dans le cytoplasme d'une bonne concentration en K^+ , est l'une des composantes nécessaires à la tolérance au sel, le maintien de la turgescence cellulaire et le déroulement des processus biochimiques (Maathuis et Amtmann, 1999). Le niveau de transcription des gènes codant pour les transporteurs de K^+ reflète probablement une différence de capacité de la plante à prélever le K^+ sous stress salin. Par exemple chez *Arabidopsis*, le stress salin augmente le niveau de transcription du gène *AtKC1* correspondant à un transporteur de K^+ (Pilot *et al.* 2003).

6.3 Synthèse d'antioxydants (exemple : les phytoestrogènes)

Les plantes produisent des espèces d'oxygène actif nommé ROS (à citer les radicaux superoxyde O_2^- , la peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les radicaux hydroxyl OH) en réponse à un stress salin (Gardès *et al.*, 2003). Les ROS causent d'importants dommages aux lipides membranaires, protéines et acides nucléiques. La détoxification des ROS constitue un élément clé de défense des plantes contre les stress abiotiques dont le stress salin. Les enzymes responsables de cette détoxification (antioxydants) incluent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, et des enzymes du cycle ascorbate-glutathion. Les polyphénols sont notamment des antioxydants les plus nombreux assurant la protection des constituants cellulaires des lésions oxydatives. Chez les plantes, la synthèse et l'accumulation des polyphénols est généralement stimulée en réponse aux stress biotiques et/ou abiotiques (Naczka et Shahidi, 2004) telle que la salinité (Navarro *et al.*, 2006). En effet, les composés polyphénoliques participent à la défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont inévitablement produites lorsque le métabolisme aérobie ou photosynthétique est entravé par des contraintes environnementales telle que la salinité (Sreenivasulu *et al.*, 2000). Autrement dit, le stress induit la chute du taux d'assimilation du CO_2 dans les feuilles (Hajlaoui *et al.*, 2006). Cette limitation de la photosynthèse provoque une réduction de la chaîne d'électrons photosynthétiques, ce qui favorise la production des dérivés réactifs de l'oxygène nuisibles à la croissance des plantes (Stepien et Johnson, 2003). Afin de réduire les dommages de cette oxydation résultante du stress salin, les plantes ont différents mécanismes d'adaptation à travers une cascade

d'antioxydants. Dans ce cas, des composés polyphénoliques jouent un rôle important en piégeant les radicaux libres (Ksouri *et al.*, 2007). Parmi ces composés polyphénoliques figurent les phytoestrogènes, qui sont notamment synthétisés par les légumineuses, jouant un rôle important dans l'adsorption et la neutralisation des radicaux libres. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que le rendement optimal en polyphénols serait obtenu dans les espèces tolérantes au stress. Les phytoestrogènes sont un groupe de composés non stéroïdaux, produits par les plantes, qui du fait de la similarité de leur structure moléculaire avec l'estradiol, sont capables de se fixer sur les récepteurs des œstrogènes. Les composés oestrogéniques les plus importants sont les isoflavones, les flavonoides et les coumestanes (Brandli *et al.*, 2010). A titre d'exemple, le trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum*) peut contenir jusqu'à 5% de sa matière sèche d'isoflavones oestrogéniques, comprenant la génistéine, la formononétine et la biochanine A (Vetter, 2004). Néanmoins, à des doses élevées, les phytoestrogènes ont été associés à l'infertilité chez les animaux (Shackell *et al.*, 1993). En outre, le fourrage contenant des œstrogènes à des niveaux élevés peut entraîner chez les ruminants (les bovins et les ovins) l'hyperœstrogénie, avec la nymphomanie, des kystes ovariens, et le gonflement des organes génitaux (Wang *et al.*, 2002). Cependant, dans les expériences examinant la réponse à la salinité des plantes de tomates avec différents niveaux d'expression de polyphénols Oxydases (PPO), Thipyapong *et al.* (2004) ont rapporté une diminution de photo-inhibition dans les plantes transgéniques à suppression du PPO par rapport aux plantes témoins à expression de PPO. En outre, la teneur en chlorophylle a été plus élevée dans les plantes stressées par rapport aux non stressées indiquant le faible stress photo-oxydant dans les plantes stressées. Ces résultats suggèrent que les PPO peuvent avoir un rôle pour éviter le stress de la plante et le développement du potentiel de photo-inhibition ainsi que les dommages de photo-oxydation (Strizh, 2008). Thipyapong *et al.* (2004) ont également montré l'existence de gènes PPO B et D dont la transcription est régulée par des zones d'abscission des pétioles des feuilles. Toutefois, le mécanisme physiologique d'activité de la PPO causé par la salinité reste à déterminer.

6.4 Synthèse de protéines induites par le sel

Chez les plantes supérieures, le stress osmotique induit différentes protéines dans les tissus végétatifs. Ces protéines sont nommées LEA : late-embryogenesis-abundant. On a même identifié des protéines spécifiques synthétisées durant la germination suite à un stress salin. A titre d'exemple la réponse des graines de soja *Glycine max* (L.) au stress salin lors de la germination est accompagnée de la synthèse des Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, glutathionne S-transférase (GST) 9, GST 10, et PM36 (protéine de

maturation des graines) à des niveaux différents. Ces protéines pourraient avoir un rôle important dans les mécanismes de défense contre le stress salin pendant la germination des graines de soja. Autre exemple à citer -cette fois ci durant la croissance- le *Medicago sativa*. Chez qui le gène *Alfin1* code pour une famille de facteurs de transcription et leur expression est corrélée avec la tolérance au sel. In vitro *Alfin1se* lie au promoteur du gène *MsPRP2*, qui code pour une protéine racinaire du cytosquelette induite par le sel. Ce gène peut être ainsi un outil efficace de la tolérance des racines au sel puisqu'ils sont les premiers à être en contact avec la salinité (Winicov *et al.*, 2004).

6.5 Accumulation d'osmoprotectants

L'accumulation des composés organiques (sucres solubles, bétaine, proline et acides organiques) a lieu essentiellement dans le cytoplasme et permet un ajustement des pressions osmotiques cytoplasme-vacuole (Foolad et Ashraf, 2007). Ils peuvent ainsi être des marqueurs intéressants pour évaluer la résistance de la plante au stress salin.

a) Accumulation de la proline

La salinité augmente la protéolyse, cette perturbation induit une accumulation d'acide, en particulier la proline, chez les halophytes comme chez les glycophytes cultivées en présence de sel (Foolad et Ashraf, 2007). L'accumulation de la proline n'est pas une conséquence de stress mais plutôt elle est métabolisée comme facteur de tolérance. Ortega *et al.* (2008) ont constaté dans leur étude d'*Opuntia streptacantha* soumise au 150 mM de NaCl durant 20 jours, que le stress entraîne la synthèse de l'ABA. D'après la même étude, cet acide induit une augmentation de l'expression du gène *P5CS* responsable de la synthèse de delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthétase, une enzyme régulatrice clé impliquée dans la biosynthèse de la proline. Tokihiko *et al.* (1999) ont signalé qu'un apport de proline exogène augmente la tolérance chez *Arabidopsis thaliana* (L.), plante considérée comme sensible. Cependant, certaines études ont montré que l'accumulation cytoplasmique de la proline en conditions de stress salin semble jouer un rôle osmorégulateur en réajustant les pressions osmotiques cytoplasme-vacuole (ajustement osmotique intracellulaire) (Lutts, 1999). Comme elle peut jouer un rôle essentiel dans la protection de l'activité photosynthétique des plantes sous stress salin (Szabados et Savoure, 2010).

b) Accumulation des sucres solubles

En conditions normales les glucides sont utilisés pour la croissance, le transport et le stockage. Alors que sous des conditions de stress salin l'accumulation est privilégiée pour contribuer à l'ajustement osmotique et au maintien de la turgescence (Haris et Ashraf, 2004).

Les sucres solubles peuvent aussi être impliqués dans la protection et/ou l'adaptation de certaines espèces aux stress abiotiques vis-à-vis de l'interaction plante-*Rhizobium*. Lopez *et al.*, 2008 dans leurs travaux comparatifs entre les deux légumineuses *Lotus japonicus* et *Medicago truncatula* ont établi une certaine tolérance de *Lotus japonicus* à la salinité par rapport à *Medicago truncatula*, successivement sous les concentrations 25 et 50 mM de NaCl. Une tolérance qui a été corrélée positivement avec la teneur de *Lotus japonicus* en sucres solubles. Ils ont également constaté que les activités enzymatiques responsables de la fourniture du carbone aux bacteroides (*Rhizobium*) pour alimenter la fixation d'azote (particulièrement la sucrose synthase) ont été moins touchées par le sel chez *Lotus japonicus* comparé à *Medicago truncatula*.

6.6 Régulation de croissance

Maintenir une croissance racinaire, constitue un caractère adaptatif dans un environnement de faible disponibilité en eau tel que le milieu salin. L'allongement racinaire peut être dû à une augmentation d'activité des enzymes impliquées dans la construction du cytosquelette (ensemble organisé des polymères biologiques de protéines qui lui confèrent l'essentiel de ses propriétés mécaniques). Cette action peut être régulée par l'ABA. En effet, Abogadallah (2010) a mis en évidence chez *Tifolium alexandrium*, que les régulations de la division et de l'élongation cellulaire sous stress salin sont effectuées par l'intermédiaire de l'ABA. Spollen *et al.* (2000) ont déterminé que chez le maïs, l'élongation racinaire est inhibée par la présence d'un inhibiteur de biosynthèse d'ABA.

6.7 Ajustement osmotique

L'ajustement osmotique est défini comme une augmentation nette de la concentration des solutés dans les tissus en réponse aux stress hydrique ou salin. Plusieurs solutés sont accumulés dans les cellules des différents organes de la plante. Ils sont appelés osmotocums tels que les acides aminés, les acides organiques, les ions et les sucres solubles. Ces solutés sont divers et leur contribution est variable (Paridaa et Das, 2005). L'ajustement osmotique permet une protection des membranes et des systèmes enzymatiques en particulier au niveau des organes jeunes (Harris et Ashraf, 2004). Dans le cas du stress salin, l'ajustement osmotique peut être bénéfique à la plante. Misra et Dwivedi (2004) ont constaté chez *Lotus creticus* que l'ajustement osmotique pourrait être un caractère bénéfique lorsque les plantes sont traitées avec des niveaux modérés de la salinité (70 mM de NaCl). A plus forte salinité

(NaCl 137 mM), la forte absorption et accumulation d'ions causent d'importants effets toxiques et induisent une déshydratation des tissus foliaires.

Certains processus tels que l'expansion cellulaire sont dépendants de l'afflux de l'eau entraîné par le maintien de faible potentiel osmotique foliaire via une augmentation nette des solutés dans les cellules (Girma et Krieg, 1992). Des estimations valables de l'ajustement osmotique peuvent être faites par la mesure du potentiel osmotique des feuilles corrigées à l'hydratation complète pour supprimer l'effet de la déshydratation (Sinchez-Blanco *et al.*, 1998).

6.8 La floraison

Les études physiologiques et génétiques des plantes ont mis en évidence que la tolérance aux différents types de stress est souvent associée à la floraison (Turner, 2000 ; Timothy *et al.*, 2006). Kobayashi *et al.* (2005) rapportent, dans leurs travaux de tolérance du blé au sel, qu'un lien est établi entre le temps de floraison et le degré de salinité appliquée. Ils ont montré l'existence des allèles *Vrn* (exigence de vernalisation) et *Ppd* (exigence de photoperiodisme) et lorsque l'allèle dominant est présent la plante accumule moins de sodium. Ces allèles dominants confèrent également une floraison précoce. Les avantages de la précocité sont reliés à la présence de bonnes conditions de développement de la plante au début de son cycle et de ses composantes de rendement qui s'élaborent durant ces moments. Toutefois, d'autres études ont montré que l'exposition au stress salin retarde la floraison. Van Zandt *et al.* (2002) ont notamment montré chez *Iris hexagona*, qu'une exposition au NaCl (4g/l) retarde la floraison par rapport aux témoins allant de 5 à 10 jours. Dadkhah (2010) a également constaté chez *Matricaria chamomilla* L. que la floraison des plantes non stressées (0 mM de NaCl) a commencé 50 jours après la germination, alors que les plantes traitées par 250 mM ont fleuri 64 jours après la germination.

Le stress salin est souvent associé à un stress hydrique dont souffre la plante. Karrou (1998) rapporte que la recherche d'une meilleure précocité est le moyen le plus utilisé pour éviter les effets du déficit hydrique sur le poids de la graine. Généralement quand la plante est stressée, elle met tout en œuvre pour hâter sa floraison et produire les graines. C'est l'un des mécanismes de survie des espèces végétales observé chez plusieurs taxa.

7. Conclusion de la synthèse bibliographique et présentation des grands axes de la thèse

Les légumineuses fourragères annuelles du genre *Trifolium* et *Lotus* ont été largement étudiées à l'échelle internationale. A l'échelle nationale, elles présentent une biodiversité et une richesse importante d'où l'intérêt de leur collection, sélection et conservation, tout en mettant des procédures de réhabilitation convenables. Elles peuvent jouer un rôle dans les systèmes intégrés culture / pâturage. Leurs techniques culturales sont sensiblement identiques et leur installation dépend de leurs exigences édapho-climatiques et de données écophysologiques. Toutefois, quand leur installation est bien réussie elles assurent une bonne productivité avec une composition chimique intéressante et une valeur alimentaire variée entre 0,64 et 0,84 UF/kg MS. Un certain nombre d'espèces appartenant à ces deux genres a été signalé comme tolérant à la salinité dans de nombreux travaux. Le Maroc n'échappe pas à son tour au problème de la salinité, il serait donc intéressant de pouvoir jumeler des variétés à cycle court et bon rendement avec une bonne tolérance à la salinité. Cette dernière, et de point de vue agronomique, correspond à une surcharge en sels minéraux de la solution du sol ou de la solution nutritive. La tolérance à la salinité est un phénomène complexe qui fait intervenir des métabolismes fortement régulés (photosynthèse, homéostasie cellulaire, accumulation des composés organiques...etc.). Les mécanismes de tolérance au sel chez les plantes peuvent être groupés en i) une homéostasie cellulaire regroupant homéostasie ionique et ajustement osmotique, ii) un contrôle et une réparation des dommages causés par le stress ou détoxification, iii) une régulation de la croissance. La définition d'un écotype sensible ou tolérant ne peut donc être basée uniquement sur les paramètres morphologiques (par exemple l'accumulation de biomasse au moment de stress). Ainsi, en raison des régulations complexes et de leurs conséquences potentielles à l'échelle du cycle de la plante, nous avons choisi de nous intéresser à plusieurs niveaux d'organisation allant de la germination à la floraison et de la plante entière aux métabolismes. Ce travail doit permettre d'identifier les caractères les plus pertinents pour l'étude de la tolérance au stress salin ainsi que d'identifier les liens qui existent entre les différents niveaux d'organisation. Deux approches complémentaires ont été employées lors de cette étude afin de couvrir le maximum des mécanismes potentiellement impliqués dans la tolérance au stress salin. La première doit permettre de proposer un modèle de la germination (dans des environnements salins) des écotypes sélectionnés sous des conditions contrôlées en se basant sur des mesures des teneurs ioniques et de la réversibilité de la germination sous des irrigations salines. Toutefois ceci demande un suivi à long terme pour pouvoir le prouver. La deuxième se base sur des mesures réalisées à la fois sur les

paramètres de croissance, de développement, de précocité et des variables physiologiques et chimiques (tel que les phyto-estrogènes dont leur synthèse est susceptible d'être stimulée en réponse aux stress biotiques et/ou abiotiques tels que la salinité) en lien avec les résultats de germination. Enfin, l'appréciation de l'interaction écotype-milieu sur une zone marocaine saline bien définie.

CHAPITRE 2

Evaluation d'une collection marocaine de légumineuses annuelles de trèfle et lotier

1. Introduction

Au Maroc, la constitution d'un germoplasme fourrager a débuté depuis longtemps. Les collectes ont été souvent conduites par les institutions nationales en collaboration avec les centres et instituts internationaux comme l'ICARDA. Dans ce sens, les légumineuses fourragères (famille des fabacées) sont une ressource essentielle pour l'amélioration des pâturages et des parcours au Maroc. Les études ont montré une part importante de l'endémisme au sein de cette famille (Fennane et Ibn Tattou, 1998). Malgré la diversité de ces ressources phytogénétiques signalée par plusieurs auteurs (Cremer-Bach, 1992 ; Bounejmate, 1995), ce patrimoine ne semble pas assez bien valorisé dans notre pays. Particulièrement, les genres *Trifolium* et *Lotus* –sujets de la présente étude– qui n'ont pas été mises à leur juste valeur. Par contre les ressources phytogénétiques des légumineuses fourragères ont été intelligemment valorisées au niveau international et ont permis le développement de cultivars d'intérêt fourrager et/ou pastoral. Divers caractères de ces ressources, comme le haut rendement et la résistance aux stress abiotiques (froid, sécheresse, salinité ...) et biotiques (maladies, insectes...), ont servi de base dans ces programmes d'amélioration. On peut citer certains exemples d'écotypes fourragers du Bassin Méditerranéen utilisés au niveau international : Demnat (Maroc) et Gabes (Tunisie) de *Medicago sativa*, Rivoli (Maroc) de *Medicago tornata*, El Golea (Algérie) d'*Ornithopus compressus* et Jebala (Maroc) d'*O. prinnatus* (FAO, 1996 ; Tazi, 1999). Ce sont les chercheurs australiens, grâce à l'efficacité de leur système de production de semences, qui ont pu –le plus– valoriser le germoplasme d'origine méditerranéenne à travers la création variétale. Cette efficacité a permis à l'Australie d'exporter des quantités de semences importantes vers différents pays (Norman *et al.*, 2000). Le Maroc est ainsi invité à bénéficier lui-même de ses propres ressources phytogénétiques soit à l'échelle nationale ou internationale. En revanche, un certain effort a été développé par notre pays pour la collecte et la création de cultivars répondant aux préoccupations des agriculteurs. On note depuis 1996 jusqu'à 2001 le nombre d'écotypes selon les espèces les plus collectées au sein du genre *Trifolium* ; *T. cherleri* : 56 ; *T. subterraneum* : 465 ; *T. resupinatum* : 52 ; *T. repens* : 62 (Hamilton *et al.*, 2001). Le genre *Lotus* –à son tour– a bénéficié de l'attention des collecteurs. L'espèce la plus collectée au Maroc est *Lotus ornithopodioides* avec 15 écotypes collectés (Snowball et Gajda, 2005). Cependant, les travaux de collecte, d'évaluation et de recherche menés ont eu des impacts souvent limités au niveau du développement des cultures fourragères et de l'amélioration des terres de parcours (M'Hirit et Maghnouj, 1999). Ceci peut être dû en outre à l'absence de

stratégie claire en matière de production de semences fourragères et pastorales. En effet, la connaissance de la variabilité génétique locale de ces deux genres peut fournir une information importante sur la façon dont les populations se comportent, en plus d'orienter toute future collection. Cette variation peut être la base de plusieurs programmes d'amélioration génétique orientés vers la conception de variétés tolérantes à des limitations spécifiques telle que la salinité. D'autre part, la caractérisation d'une collection de populations consiste à enregistrer les caractéristiques morphologiques et agronomiques héritées, qui peuvent être facilement observées, et qui s'expriment en fonction de leurs environnements d'origine d'où l'intérêt de ce chapitre, dont les objectifs sont :

- L'évaluation agro-morphologique d'une collection marocaine de trèfles et lotiers.
- La caractérisation de cette collection marocaine à l'aide de l'analyse multivariée.
- La quantification de la diversité disponible au sein des populations marocaines de *Trifolium* sp. et *Lotus* sp. de diverses origines géographiques en utilisant un certain nombre de caractéristiques morphologiques et agronomiques.
- La sélection de meilleurs écotypes pour leur durée de cycle végétatif, rendement en biomasse, en graines...

2. Matériels et méthodes

2.1 Présentation du matériel génétique

L'étude a été réalisée sur 100 écotypes appartenant à 11 espèces annuelles du trèfle et du lotier collectées par des chercheurs de l'I.N.R.A de rabat et conservées dans la banque de gènes. Le tableau 5 présente les espèces étudiées, leur nombre d'écotypes et leurs origines. Les caractéristiques de chaque site de collecte sont détaillées dans le tableau 6. Une variété australienne Paradana de l'espèce annuelle *T. michelianum* a été utilisée comme témoin. Cette variété a été utilisée tout au long de la présente étude vu son bon rendement en biomasse et sa tolérance à la salinité (Ballard *et al.*, 2002).

2.2 Site et dispositif expérimentaux

L'étude a été effectuée de novembre 2007 à mai 2008 dans la station expérimentale de Guich à l'INRA de Rabat (34°03' N, 06°46' O). Le sol est sablonneux, de pH 7,3, pauvre en matière organique (1,5%), avec des teneurs modérées en phosphore (65 ppm) et en potassium (159 ppm). Cette station appartient au domaine bioclimatique subhumide avec des variations

semi-arides. Soumise à une double influence continentale et océanique, la pluviométrie moyenne varie entre 400 et 500 mm/an.

Les graines de chaque écotype et de la variété Paradana ont été scarifiées et mises à germer dans des boîtes de Petri le 1^{er} novembre 2007 sur du papier filtre imbibé d'eau, puis repiqués dans des plaques alvéolées remplies de tourbe le 5 novembre 2007.

Les plantules ont été transplantées au champ le 20 novembre 2007 au stade de 3-4 feuilles. Le dispositif expérimental a été constitué de microparcelles composées de deux lignes jumelées espacées de 20 cm (4 plantes/ligne). L'espace entre les plantes a été de 25 cm et l'espace entre les écotypes a été de 1 m. Un engrais de fond P_2O_5 a été appliqué à raison de 45 kg /ha. Le système d'arrosage a été la goutte à goutte (Figure 2).

2.3 Mesures effectuées

Les variables mesurées ont été évaluées sur la base des descripteurs de légumineuses fourragères (Andersen et Ellis Davies, 1984), elles sont décrites dans le tableau 7. Les notations concernant le développement végétatif (hauteur de la plante, taille des feuilles) ont été prises périodiquement une fois sur une quinzaine de jours. Les notations concernant la floraison, le nombre et la production de graines ont été effectuées régulièrement dès le début de floraison (tous les 2-3 jours). La mesure de la production de matière sèche a été réalisée pour chaque espèce au stade floraison. La résistance aux maladies a particulièrement concerné les attaques de la rouille et de l'oïdium. Les notes visuelles des symptômes sont données sur une échelle de 0 à 9.



Figure 2. Évaluation au champ (station de Guich) de la collection de trèfles et de lotiers

2.4 Analyses statistiques

Les données obtenues ont été soumises à une analyse statistique descriptive au niveau de l'espèce et de l'écotype. Les moyennes (comparées par le test LSD) et les coefficients de variation ont servi à caractériser la tendance centrale et la dispersion de chacun des traits mesurés. La variation intra et interspécifique a été examinée par l'analyse du degré d'association entre les différentes caractéristiques morphologiques, phénologiques et agronomiques à travers le calcul des coefficients de corrélation suivie de : i) une analyse de variance hiérarchique (Anova) séparant la variance observée en trois niveaux : entre espèces, entre écotypes au sein de la même espèce et entre régions de collecte, ii) une analyse en composantes principales (ACP) et iii) une classification hiérarchique (dendrogramme) permettant de révéler les similitudes entre les comportements des espèces. Ces classifications ont eu pour objectif de reconnaître si les écotypes se différenciaient dans des groupes homogènes en accord avec leur origine. L'ensemble de ces analyses a été réalisé au moyen des programmes SAS System (version 8) et Genstat 5 (version 4.1). Les tests de variance n'ont été appliqués que sur les espèces ayant un nombre d'écotypes > 3 (*T. scabrum* est exclu vu le faible nombre d'écotypes prélevés).

Tableau 5. Liste des écotypes du *Trifolium* et *Lotus*, leur nombre et leurs sites d'origine

Espèce	Abréviation de l'espèce	Nombre d'écotypes	Sites de collecte
<i>Trifolium arvense</i> L.	a	9	S4, S7, S11, S12, S15, S16, S17, S18, S19,
<i>Trifolium bocconeii</i> Savi	b	7	S4, S5, S6, S7, S12, S13, S14
<i>Trifolium campestre</i> Schreb.	c	9	S1, S2, S3, S4, S12, S11, S13, S15, S17,
<i>Trifolium cherleri</i> L.	ch	8	S4, S5, S8, S11, S10, S12, S19, S20
<i>Trifolium glomeratum</i> L.	g	12	S1, S2, S3, S4, S7, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17
<i>Trifolium isthmocarpum</i> Brot.	i	19	S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20
<i>Trifolium resupinatum</i> L.	r	8	S4, S5, S6, S7, S8, S10, S12, S13
<i>Trifolium scabrum</i> L.	sc	3	S1, S2, S3
<i>Trifolium stellatum</i> L.	st	6	S7, S8, S10, S11, S12, S16
<i>Trifolium tomentosum</i> L.	t	8	S1, S2, S3, S4, S8, S10, S11, S12
<i>Lotus ornithopodioides</i> L.	o	11	S8, S9, S10, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S20

Tableau 6. Caractéristiques des sites de collecte des écotypes du *Trifolium* et *Lotus*

Site	Région	Alt (m)	Lat	Log	m* (°C)	M* (°C)	pH du sol	P (mm)	Topographie	Type du sol	Intensité du pâturage	Etage bioclimatique
S1	Sidi Hajjaj	628	32,92	7,29	6,3	39,8	8,8	242	Plaine	Limon sablonneux	Importante	Semi-aride à hiver chaud
S2	Sebt-des-Brikyine	447	32,29	8,05	4,3	40,4	7,9	200	Plaine	Sablonneux	Nulle	Aride à hiver chaud
S3	Had-Harrara vers Oualidia	108	32,48	9,11	7,9	39,2	8,3	294	Plaine côtière	Sablonneux	Modérée	Semi-aride
S4	Sidi-Allal Bahraoui	146	34,04	6,69	4,8	29,9	6	399	Plaine côtière	Très sablonneux	Importante	Semi-aride à hiver tempéré
S5	Dar-Bel-Amri	36	34,21	6,49	4,8	31,6	6,1	399	Plaine	Sablonneux	Importante	Semi-aride à hiver tempéré
S6	Sidi-Slimane	50	34,26	5,87	4,3	32,5	7,2	320	Plaine inondable	Limon argileux	Nulle	Semi-aride à hiver tempéré
S7	Moulay-Bousselham	30	34,88	6,23	6	32	6,5	552	Plaine côtière inondable	Limon sablonneux	Importante	Semi-aride à hiver tempéré
S8	Asilah	10	35,63	5,97	7,8	27,8	7,8	614	Côte	Limon argileux	Faible	Humide à hiver frais
S9	Marina à Smir	0	35,75	5,34	9,1	27,7	9	650	Dune côtière	Sablonneux calcaire	Nulle	Sub-humide à hiver chaud
S10	Chefchaouen	440	35,39	5,38	7,1	26,8	8	725	Colline	Limon	Modérée	Sub-humide à hiver frais
S11	Rommani	160	33,72	6,72	5,3	35	7,3	480	Affleurement rocheux	Limon sablonneux	Modérée	Semi-aride à hiver tempéré
S12	Khemisset	430	33,77	6,16	5,3	34	7	400	Colline	Limon sablonneux	Importante	Semi-aride à hiver tempéré
S13	Khemisset	350	33,68	6,23	5,3	34	7,5	400	Colline	Limon argileux	Modérée	Semi-aride
S14	Khemisset	370	33,68	6,16	5,3	34	6,8	400	montagne	Limon sablonneux	Modérée	Semi-aride
S15	Entre Tiflet et Maaziz	420	33,73	6,09	5,3	34	6,7	400	Affleurement rocheux	Limon sablonneux	Importante	Semi-aride
S16	Tiflet	860	33,63	5,97	5,3	34	6,9	400	Plaine	Limon sablonneux	Importante	Semi-aride
S17	Tiflet	432	33,70	6,22	5,3	34	6,4	400	Colline	Limon argileux	Modérée	Semi-aride
S18	Maaziz	486	33,68	6,13	5,3	34	6,3	400	Colline	Limon argileux	Modérée	Semi-aride
S19	Maaziz	510	33,78	6,27	5,3	34	7,5	400	Colline	Limon argileux	Importante	Semi-aride
S20	Maaziz	430	33,09	6,11	5,3	34	8	400	Colline	Limon sablonneux	Modérée	Semi-aride

* m et M : températures minimales et maximales moyennes

Tableau 7. Description des variables morpho-phénologiques et reproductives mesurées

Variable	Unité	Code	Description
Hauteur de plante	cm	HP	Moyenne de la hauteur des plantes, mesurée de la base de la tige à l'extrémité de l'inflorescence, le jour de la récolte
Taille de feuille	cm	TF	Largeur de la feuille, prise sur une feuille du nœud de la 1 ^{ère} fleur
La floraison	jour	F	Nombre de jours depuis la germination jusqu'au stade "50% de fleurs ouvertes"
Inflorescence par plante	nombre	IP	Poids total de graines par plante divisé par le poids moyen de graines par inflorescence
Graines par inflorescence	nombre	GI	Nombre moyen de graines par inflorescence (évalué sur 10 inflorescences choisies au hasard par plante)
Poids de 1000 graines	mg	PMG	Poids de 1 000 graines
Production de graines par plante	g	PG	Poids total de toutes les graines par plante
Ramification	nombre	NR	Nombre de ramifications primaires par plante
Résistance aux maladies	De 0 à 9		La note 0 est attribuée à une plante indemne des symptômes ; 1 à 3 de légères symptômes plantes peu sensibles, 4 à 6 des symptômes modérés, plantes moyennement sensibles et 7 à 9 des symptômes sévères, plantes hautement sensibles
Matière sèche	g/m ²	MS	Mesurée au stade de floraison. Les plantes coupées et pesées fraîches, puis 500 g de matière verte de chaque parcelle est prélevée et séchée à l'étuve pendant 72h à 70°C pour déterminer le poids sec.

3. Résultats

3.1 Description des traits morpho-phénologiques et agronomiques

3.1.1 Variation interspécifique

Des différences statistiques significatives ($p < 0,001$) ont existé entre les différentes espèces pour la majorité des traits étudiés (Tableau 8). Cependant la variabilité étudiée dans cette partie doit être prise avec précaution vu le nombre faible des écotypes échantillonnés pour chaque espèce.

a) Traits morphologiques

Les variables morphologiques ont révélé une supériorité de *T. isthmocarpum* par rapport aux autres espèces.

La hauteur de la plante (HP) a différencié quatre groupes. Le premier est formé par *T. isthmocarpum*, la variété Paradana de *T. michelianum* et *L. ornithopodioides* qui ont enregistré les tailles les plus élevées (77 cm en moyenne). Suivi par le groupe formé par les espèces *T. glomeratum* et *T. resupinatum* (60 cm en moyenne) et les espèces *T. arvense* et *T. stellatum* avec des valeurs intermédiaires. Ensuite les espèces *T. campestre*, *T. cherleri*, *T. scabrum* et *T. tomentosum* ont des tailles nettement plus faibles par rapport aux autres. Enfin

en dernier lieu l'espèce *T. bocconeii* forme à elle seule un groupe et représente la taille la plus petite par rapport à toutes les espèces étudiées.

La taille des feuilles (TF) a différencié ces mêmes groupes. On trouve toujours en premier lieu l'espèce *T. isthmocarpum* avec des feuilles les plus grandes. Suivis des espèces *T. resupinatum*, *T. glomeratum*, *T. michelianum* et *L. ornithopodioides*. Tandis que les espèces *T. arvense* et *T. bocconeii* ont présenté les feuilles les plus petites.

b) Traits phénologiques

La floraison (F) montre que les espèces *T. arvense* et *T. bocconeii* ont été les plus précoces, tandis que *T. cherleri*, *T. stellatum*, *T. campestre*, *T. glomeratum* et *L. ornithopodioides* ont été les plus tardives, l'écart maximal entre les deux groupes a atteint 29 jours. Les autres espèces ont eu des durées de cycle intermédiaires. On signale qu'on a admis la classification suivante : espèce très précoce < 70 jours ; précoce entre 70 et 90 ; semi précoce entre 90 et 100 ; tardive > 100 et très tardive > 120.

c) Traits agronomiques

Le nombre d'inflorescences (IP) par plante révèle la supériorité des espèces *T. arvense* et *T. isthmocarpum* avec en moyenne 200 inflorescences par plante.

Le nombre de graines par inflorescence (GI) ne montre pas une grande différence entre les espèces testées, puisque ce paramètre a révélé deux groupes d'espèces. *T. arvense* a affiché la valeur la plus élevée, suivie par le reste des espèces.

Le Poids de 1000 graines (PMG) et la production de graines (PG) indiquent la performance de *T. isthmocarpum*. Le test LSD révèle quatre groupes. Le premier groupe contient l'espèce *T. isthmocarpum* seule, qui a enregistré le PMG le plus élevé de 2,05 g et une production de graines de l'ordre de 29 g par plante. Le deuxième groupe est composé de *T. bocconeii*, *T. cherleri*, *T. resupinatum* et *L. ornithopodioides* avec un PMG de l'ordre de 1,04 g en moyenne. Le troisième groupe regroupe les espèces *T. campestre*, *T. glomeratum* et *T. stellatum* et *T. michelianum*. Enfin le groupe *T. arvense*, *T. scabrum* et *T. tomentosum* avec les valeurs les plus faibles.

La production de la matière sèche (MS) montre quatre groupes d'espèces : *T. isthmocarpum* avec une moyenne de 1 020 g/m² à côté de la variété Paradana. En deuxième lieu, on rencontre *L. ornithopodioides*. Le troisième groupe inclut *T. resupinatum* et *T. glomeratum* avec 534 g/m². Alors que le quatrième groupe comprend *T. bocconeii*, *T. stellatum*, *T. campestre*, *T. cherleri*, *T. scabrum*, *T. tomentosum* et *T. arvense* avec les valeurs les plus basses, entre 320 et 128 g/m².

Tableau 8. Comparaison de moyennes des traits observés pour les espèces étudiées de trèfle et de lotier

Espèce	HP (cm)	TF (cm)	F (jours)	IP	GI	PMG (g)	PG (g)	MS (g/m ²)
<i>T. arvense</i>	52,20b	0,23c	81b	203a	48a	0,35d	19,78b	128d
<i>T. bocconeii</i>	12,00d	0,18c	79b	96c	15b	0,95b	8,00c	110d
<i>T. campestre</i>	23,70c	1,08b	107a	117c	20b	0,68c	27,47a	254d
<i>T. cherleri</i>	24,73c	1,12b	103a	89c	17b	1,15b	11,28b	320d
<i>T. glomeratum</i>	60,06b	2,20ab	111a	110c	34ab	0,69c	36,04a	482c
<i>T. isthmocarpum</i>	82,7a	3,69a	99ab	189a	25b	2,05a	29,02a	1020a
<i>T. resupinatum</i>	60,35b	2,80ab	90ab	145b	33ab	1,07b	32,31a	586c
<i>T. scabrum</i>	23,40c	1,00b	96ab	78c	19b	0,32d	13,43b	184d
<i>T. stellatum</i>	50,18b	0,80b	104a	90c	16b	0,62c	12,44b	122d
<i>T. tomentosum</i>	28,83c	0,92b	96ab	87c	22b	0,32d	17,52b	362d
<i>L. ornithopodioides</i>	75,08a	2,00ab	110a	85c	18b	0,98b	33,76a	800b
<i>Paradana</i>	72,10a	2,00ab	90ab	94c	20b	0,73c	29,00a	1090a

Dans une colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne diffèrent pas au seuil de 5% selon le test LSD

d) Résistance aux maladies

L'observation des maladies a été faite en condition d'inoculation naturelle et non artificielle. La maladie la plus rencontrée a été la rouille commune des trèfles causée par *Uromyces trifolii* aussi bien sur les tiges, les pétioles que les feuilles. L'incidence des maladies sur les différentes espèces a été différente. La rouille commune a été fréquente sur les espèces *T. tomentosum* et *T. scabrum*. Les autres espèces ont été légèrement ou moyennement sensibles à la rouille et à l'oïdium, à l'exception de *L. ornithopodioides* qui a montré une bonne résistance à ces maladies (Annexe 1).

3.1.2 Variation intraspécifique

a) Traits morphologiques et agronomiques

Les valeurs des traits étudiés pour chaque écotype au sein de chaque espèce sont détaillées dans l'Annexe 1. L'analyse de l'ANOVA a montré globalement une variation significative ($P < 0,01$) entre les écotypes de chaque espèce. D'une façon générale, les traits liés à la production de biomasse et au développement phénologique des plantes sont nettement plus variables que ceux liés au développement morphologique. Toutefois, la variabilité étudiée dans cette partie doit être prise avec réserve vu le nombre faible des écotypes échantillonnés pour chaque espèce.

T. arvense et *T. cherleri* : des différences hautement significatives ($P < 0,001$) ont existé entre les écotypes au sein de chacune de ces espèces pour les traits morphologiques. Les

écotypes originaires des sites 4, 11 et 12 ont présenté des valeurs élevées concernant ces paramètres.

T. campestre : l'écotype 3 s'est distingué par sa précocité pour les caractères phénologiques et l'écotype du site 17 a été le plus tardif. Concernant le développement végétatif, une meilleure croissance chez l'écotype du site 4 a été remarquée par rapport aux autres. Elle a atteint une HP de 36 cm alors que les autres n'ont pas dépassé 25 cm.

T. glomeratum et *T. resupinatum* : des différences significatives ont existé entre les écotypes de ces deux espèces pour l'ensemble des traits étudiés ($P < 0,01$). Les caractéristiques morphologiques des plantes ont présenté des niveaux intermédiaires de variabilité, entre 20% et 30%. La F a été le seul trait du développement des plantes avec une importante variabilité (40% et 48%).

T. isthmocarpum : des résultats très hautement significatifs ont caractérisé les écotypes de cette espèce ($P < 0,001$). L'écotype 2 a été plus précoce que les autres, pour les caractères phénologiques étudiés. Le GI a présenté le plus grand coefficient de variation entre les écotypes (40%). Les variables morphologiques ont montré des coefficients de variation intermédiaires, compris entre 10% et 23%.

T. stellatum et *T. bocconeii*: Aucune différence significative n'a été enregistrée au sein des écotypes de cette espèce pour la majorité des traits étudiés.

T. tomentosum : l'écotype 12 s'est distingué par sa production élevée en MS par rapport aux autres écotypes. Quant à la F, les écotypes 10 et 11 ont été les plus tardifs.

L. ornithopodioides : la F et la PG ont beaucoup varié entre les écotypes. Cependant, les coefficients de variation de l'ensemble des traits morphologiques ont été faibles et voisins de 14%.

D'après ces résultats et sur la base de l'ensemble des traits observés pour toutes les espèces étudiées, *T. campestre* et *T. stellatum* ont présenté la variabilité la plus faible, alors que *T. isthmocarpum* a eu des coefficients de variation généralement élevés.

b) Groupement des écotypes de différentes espèces selon leur cycle végétatif

L'analyse de variance a révélé un effet très hautement significatif des écotypes pour ce paramètre ($P < 0,001$). La comparaison des moyennes de la F par le test LSD a révélé trois groupes selon leur cycle végétatif (Figure 3 et Annexe 1):

- Un groupe à cycle court (moins de 70 jours entre le semis et la floraison) représenté par les espèces *T. arvense*, *T. bocconeii*, *T. isthmocarpum*, *T. resupinatum* et *T. scabrum*, un écototype pour chacune, sauf pour *T. arvense* avec quatre écotypes, trois

écotypes pour *T. bocconeii* et deux pour *T. isthmocarpum*. Un total de 12 écotypes très précoces.

- Un groupe à cycle long (plus de 120 jours) représenté par deux écotypes pour chacune des espèces suivantes : *T. campestre*, *T. glomeratum* et *L. ornithopodioides*, ainsi qu'un seul écotpe pour *T. stellatum*. Un total de 7 écotypes très tardifs.
- Un groupe à cycle moyen (entre 70 et 120 jours), représenté par l'ensemble des écotypes et espèces restantes ainsi que la variété Paradana avec 90 jours. Un total de 81 écotypes précoces à semi précoces.

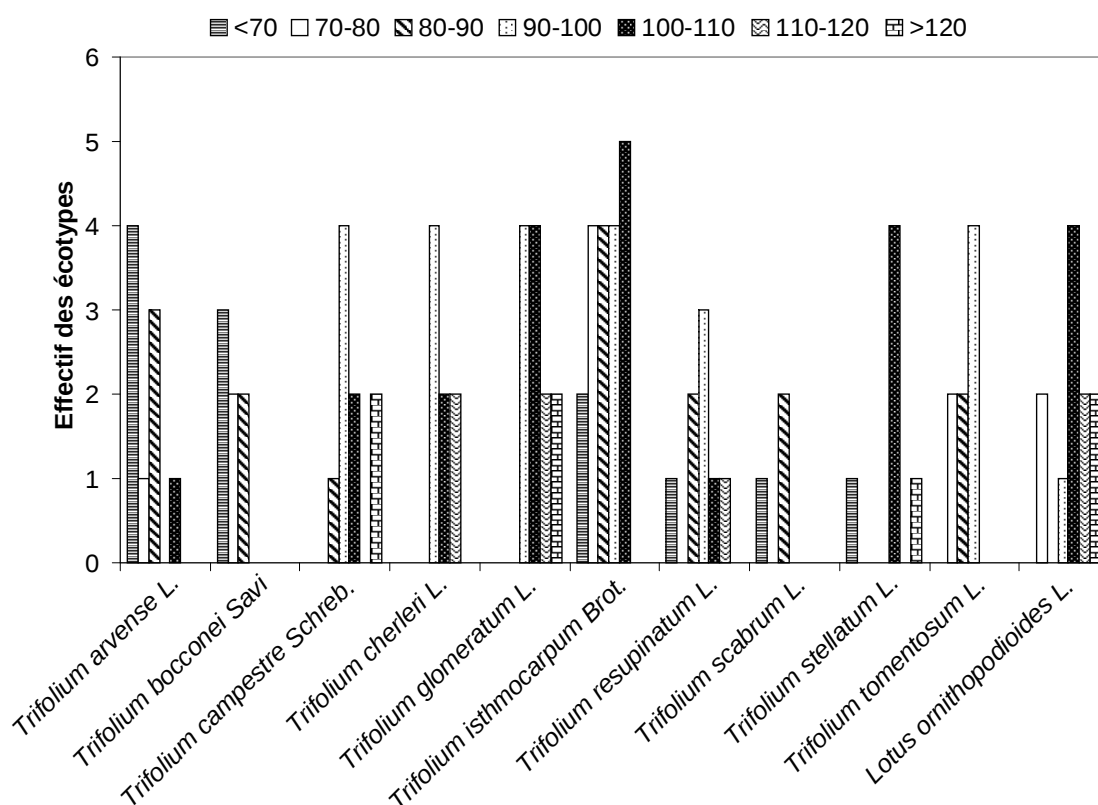


Figure 3. Effectif des écotypes du trèfle et lotier en fonction de la floraison exprimée en jours (j)

c) Résistance aux maladies

Des différences importantes ont été enregistrées entre les écotypes en réponse aux maladies, toutefois l'observation des maladies a été faite en condition d'inoculation naturelle et non artificielle.

Chez *T. isthmocarpum* à l'exception des écotypes i6, i10, i12 et i14 qui se sont avérés très sensibles à l'oïdium, les autres écotypes ont été moyennement sensibles à la rouille et à l'oïdium.

La majorité des écotypes de *L. ornithopodioides* ont été résistants à l'oïdium. Par ailleurs la totalité d'écotypes de *T. tomentosum* et les écotypes sc2 et sc3 de *T. scabrum* ont été hautement sensibles à la rouille. Toutefois, les autres écotypes de *T. campestre* et *T. stellatum* ont été légèrement sensibles à l'oïdium avec des indices d'attaque différents entre les écotypes.

Chez *T. glomeratum*, l'écotype g4 s'est distingué des autres écotypes par une excellente résistance à l'oïdium et à la rouille. Les écotypes g7, g11, g12 et g13 ont été très sensibles aux maladies tandis que les autres ont été légèrement sensibles.

Néanmoins, les écotypes r4, r7 et r12 de *T. resupinatum* ont été sensibles à l'oïdium et la rouille.

3.2 Analyses de corrélation entre traits morpho-phénologiques et agronomiques

La corrélation a été étudiée car elle permet de retrouver et de quantifier des liens de dépendance entre les traits morphologiques, phénologiques et agronomiques. Les coefficients de corrélation entre les différents traits observés sont présentés dans le tableau 9. Les traits liés à la vigueur des plantes HP et NR ont eu une corrélation positive avec la PG. Les corrélations positives entre les principaux caractères évalués apparaissent comme suit: la floraison (F) avec le nombre d'inflorescences par plante (IP) (0,981), la production de graines par plante (PG) (0,965) et la production de la matière sèche (MS) (0,491). Le nombre d'inflorescences par plante (IP) avec le PMG (0,931) et la PG (0,757). La corrélation positive la plus forte pour la PG a été avec le NR et la F.

Tableau 9. Coefficients de corrélation entre traits morpho-phénologiques et agronomiques

Traits	HP	TF	NR	F	IP	GI	PMG	PG	MS
HP	1	0,746	0,419	0,443	0,304	0,247	0,436	0,604**	0,824
TF		1	-0,368	0,51	0,013	-0,203	0,7	0,695	0,946
NR			1	0,032	-0,711	0,25	0,22	0,982**	0,841
F				1	0,981*	-0,794	0,302	0,965*	0,491*
IP					1	0,821	0,931*	0,757*	0,017
GI						1	-0,2	0,269	-0,064
PMG							1	0,253	0,617
PG								1	0,734
MS									1

** ; * Les coefficients sont significatifs respectivement à $P \leq 0,01$ et $P \leq 0,05$ respectivement

3.3 Influence des facteurs climatiques des sites de collecte

Le tableau 10 résume l'influence des facteurs climatiques des lieux de provenance sur les paramètres agro-morphologiques. L'analyse de corrélation a montré que la pluviométrie

annuelle moyenne a été le facteur environnemental le plus corrélé (positivement) avec les caractères étudiés, principalement avec le début de floraison. En effet des écotypes à floraison tardive correspondent à des régions plus humides.

Tableau 10. Influence des facteurs climatiques sur les critères morpho-phénologiques et agronomiques de différents écotypes

Facteurs Caractères	Altitude (m)	Pluviométrie (mm)	Longitude	Latitude	T° min (°C)	T° max (°C)	pH du sol
HP	-0,291	0,160*	-0,153	0,243**	0,114	-0,206*	0,04
TF	-0,242	0,194*	-0,219**	0,267	0,098	-0,166*	0,022
NR	-0,072	0,092*	0,006	0,062	0,039	-0,049	0,044
F	-0,046	0,415***	-0,284**	0,270**	0,185*	-0,094	0,08
IP	0,457	0,399	0,723	0,544	0,854	0,002	0,267
GI	0,205	0,355	0,125	0,345	0,042	0,109	0,364
PMG	-0,260*	0,074	-0,092	0,168	0,029	-0,136	-0,036
PG	0,988	0,163	0,061	0,766	0,235	0,065	0,083
MS	-0,09	0,174*	-0,286***	0,257**	-0,041	0,029	-0,096
Attaque de maladies	0,17	0,085*	0,008	0,256	0,094	0,129*	0,026

Les coefficients sont significatifs respectivement à * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ et *** $p \leq 0,001$

3.4 Analyse en composantes principales et classification hiérarchique

a) Selon les variables morpho-phénologiques et agronomiques des écotypes

L'analyse basée sur les moyennes des variables observées au sein de chaque écotype est présentée dans la figure 4. Les deux premiers axes de l'analyse en composantes principales (ACP) absorbent 75% de la variance totale. L'axe 1 est corrélé positivement à la production de MS, aux tailles des plantes (HP), de la feuille (TF), au nombre d'inflorescences par plante (IP) et à la production de graines par plante (PG). L'axe 2 est corrélé positivement au poids de 1 000 graines (PMG), à la floraison (F) et au nombre de graines par inflorescence (GI).

Les écotypes de *T. isthmocarpum* (i7, i8, i10, i11 et i12) originaires des sites S7, S8, S10, S11 et S12 ont formé un groupe qui s'est distingué par une précocité importante à la floraison, une biomasse élevée et une grande hauteur. Ils ont été légèrement sensibles aux maladies.

Les cinq écotypes ch5, ch11, ch12, ch19 et ch20 du *T. cherleri* ont été tous groupés au sein du même groupe caractérisé par une floraison précoce. Ils sont originaires des régions caractérisées toutes par des températures élevées du mois le plus chaud.

Les écotypes sc1, sc2, sc3, t1 et t2 forment un groupe. Ce dernier se caractérise par une faible production en MS et en PG, une faible hauteur de plante, une sensibilité aux maladies légère à moyenne et une précocité à la floraison très élevée.

Chapitre 2. Evaluation d'une collection marocaine de légumineuses annuelles de trèfle et lotier

sites 8 et 9 avec des valeurs élevées de pH. Les températures minimales élevées - par rapport aux autres sites - sont une autre caractéristique de ce groupe. Les espèces rencontrées sont *T. cherleri*, *T. isthmocarpum*, *T. resupinatum*, *T. stellatum*, *T. tomentosum* et *L. ornithopodioides*. En outre, sur le site 9, une seule espèce a été collectée il s'agit de *L. ornithopodioides*.

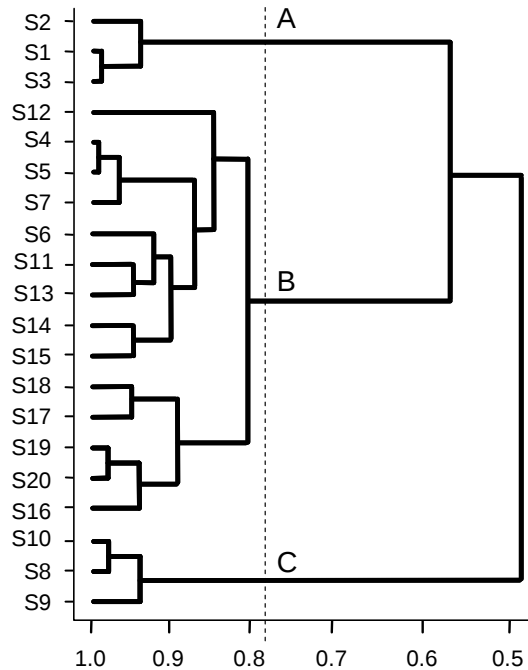


Figure 5. Dendrogramme sur la base des traits édapho-climatiques illustrant la similarité des vingt sites de collecte

c) Selon les paramètres géographiques et climatiques des sites de collecte

Les trois premiers axes de l'APC expliquent 86,25% de la variance quantitative des données géographiques et climatiques (Figure 6). Les variables qui expliquent cette variation sont:

Pour l'axe PC1 et par ordre d'importance sont la latitude, la pluviométrie annuelle moyenne, température moyenne maximale de mois le plus chaud et l'altitude.

Pour l'axe PC2 il s'agit de la longitude, le pH du sol et la température minimale du mois le plus froid.

Six grands groupes peuvent être séparés selon la figure 6: le groupe A renferme les basses températures du mois le plus chaud et le pH élevé du sol. Le groupe B avec des précipitations annuelles élevées et de faibles longitudes. Le groupe C avec un pH faible du sol. Le groupe D renferme les basses températures du mois le plus froid. Le groupe F avec une longitude élevée et enfin le groupe E composé de deux sites (5 et 6) avec une faible pluviométrie annuelle.

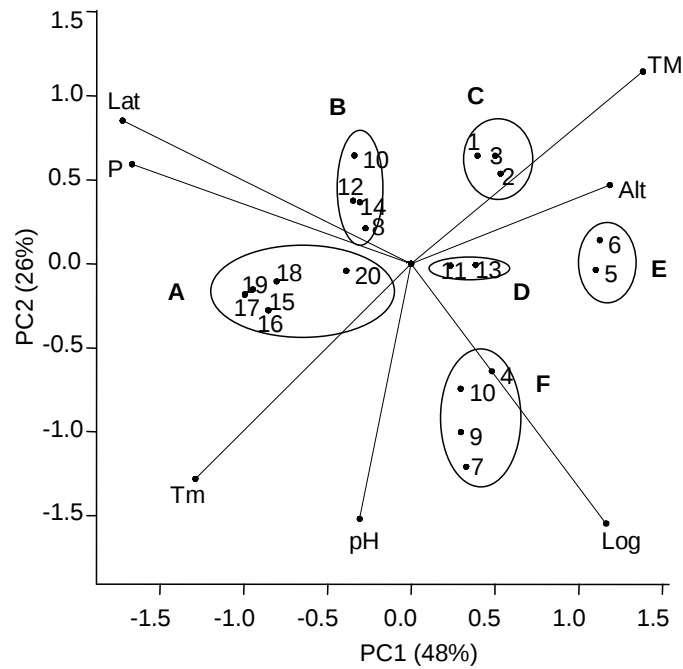


Figure 6. Dispersion des sites de collecte dans le plan engendré par les deux premiers axes de l'ACP selon les variables géographiques et climatiques de chaque site (les sites 1 à 20).

* pH: pH du sol

4. Discussion

4.1 Distribution des espèces suivant les paramètres climatiques et écogéographiques

La plupart des sites visités par les collecteurs de l'INRA ont été situés le long de la côte. Les données géographiques et climatiques ont été analysées par l'ACP, pour évaluer les différences entre chaque site de collecte. Cette analyse a révélé six groupes distincts. Aucune espèce n'a été limitée à un seul groupe, seulement une ou deux variables écogéographiques ont été nécessaires pour relier les sites où les espèces ont été collectées. En effet, une analyse discriminante de la survenance du *Trifolium* au Maroc réalisée par Beale *et al.* (1993) a révélé que les précipitations annuelles et le pH du sol ont été les facteurs écogéographiques les plus importants à expliquer la distribution des espèces du *Trifolium*. Ayres *et al.* (2008) ont indiqué que la distribution du *L. ornithopodioides* a été tributaire de la pluviométrie élevée. Le pH du sol a également été jugé être un facteur important dans cette étude, comme dans d'autres études écogéographiques (Pederson *et al.*, 1999; Bennett, 2000), ainsi que les précipitations annuelles révélées être importantes dans l'ACP. L'importance de la longitude comme une variable discriminante dans nos analyses écogéographiques (l'APC) est à noter. D'ailleurs, des corrélations significatives entre la longitude et la distribution des populations algériennes du *T. tomentosum* (Issolah et Abdelguerfi, 2000) et les espèces du *Trifolium* au sud-ouest de la Turquie (Bennett, 2000) ont déjà été relevées. En revanche, les résultats de cette étude montrent que la distribution des espèces de *Lotus* et *Trifolium* au Maroc varie en

fonction des conditions pédologiques et climatiques. Les variables écogéographiques les plus importantes dans le regroupement des sites sont comme suit : la pluviométrie annuelle moyenne, la longitude et le pH du sol. Entre les onze espèces étudiées, aucune n'a été trouvée sur tous les sites. *T. isthmocarpum*, *T. glomeratum* et *L. ornithopodioides* ont été les espèces les plus couramment collectées. Un autre constat remarquable dans cette collection, est la présence de *L. ornithopodioides* sur le site 9 où on note une absence totale de toutes les autres espèces. L'intensité du pâturage pourrait expliquer l'absence des autres espèces, mais on enregistre qu'elle est nulle dans ce site (Tableau 6). Ainsi, la présence de cette espèce, seule, dans le site 9 (situé sur une dune côtière) peut être expliquée par sa tolérance à la salinité signalée par certains auteurs (Bennani *et al.*, 2010 ; Nichols *et al.*, 2010a).

4.2 Structure de la variation intra et interspécifique

Bien que le nombre d'écotypes au sein de chaque espèce soit restreint, l'étude a mis en évidence une variabilité **intraspécifique** importante pour tous les caractères étudiés. Cependant ce nombre restreint reste une limite pour la confirmation de ce constat. L'ACP indique que les traits morpho-phénologiques et agronomiques d'écotypes des 11 espèces étudiées les différencient nettement entre elles. La prépondérance de contrastes géographiques suggère que la différenciation des écotypes reflète avant tout des différences de pression de sélection du milieu, plus sévère dans les sites 1, 2 et 3 du fait de la sécheresse (en moyenne 39°C TM, et 245mm P) intermédiaire dans les sites 8, 9 et 10, et plus modérée dans le reste des sites. Ces gradients écologiques se traduisent tout d'abord sur les traits phénologiques des écotypes, par des floraisons plus précoces et des cycles plus courts là où le climat est plus rude. On constate ainsi que la précocité a constitué une adaptation à la brièveté de la saison des pluies dans les sites 1, 2 et 3. En effet, de nombreuses cultures annuelles, par exemple *Cicer arietinum* L. (Varshney *et al.*, 2009) et *Trifolium alexandrinum* L. (Farooq *et al.*, 2009) présentent ce type d'adaptation par évitement de la sécheresse chez leurs variétés occupant des zones semi-arides. Par contre, selon nos résultats les paramètres morphologiques (HP et TF) ont été peu sensibles aux variations environnementales.

De point de vue **intraspécifique** on note les particularités suivantes :

T. scabrum est une espèce de zones arides (Abdelguerfi et Laouar, 1999). Elle se trouve uniquement dans trois sites semi-arides à arides et à hiver chaud (sites 1, 2 et 3) et de pluviométrie annuelle inférieure à celle des autres sites. Cette espèce, bien que collectée dans des sites éloignés par la distance, ont en commun de provenir de milieux écologiquement difficiles.

A l'opposé, *T. isthmocarpum* est l'espèce la plus représentée dans la majorité des régions de collecte. En effet, *T. isthmocarpum* est connue pour l'importance de son aire de répartition vu sa variabilité génétique. Son niveau de production peut être élevé sur différents types de sols (de sablonneux à argileux). Par ailleurs, elle préfère les zones humides (Dear *et al.*, 2003), ce qui explique le regroupement des populations originaires des aires à importante pluviométrie sur l'ACP. Les caractéristiques phénologiques des écotypes varient selon leur région de collecte (Annexe 1). Par exemple, les écotypes des sites 1, 2 et 3 ont présenté une précocité de floraison par rapport aux écotypes des autres sites. Ils ont été suivis par les écotypes originaires des sites 7, 8, 10, 11 et 12 puis par ceux provenant des sites 18, 19 et 20, qui ont été les plus tardifs. Les écotypes précoces du site 2 ont eu une production faible en MS (en moyenne 630 g/m²). Toutefois, les écotypes à floraison semi précoce ou tardive ont été les plus productives, entre 900 et 1 200 g/m². Selon la comparaison du comportement des écotypes de toutes les espèces on note cette même stratégie suivie pour les écotypes en provenance du même site de collecte. Ainsi, les écotypes des différentes espèces de trèfle aux stratégies largement semblables forment un groupe homogène. Il se peut que les sites de collecte forment des mosaïques de micro-environnements différents, chacun privilégiant une combinaison différente de caractéristiques de la reproduction, combinaison qui permet ainsi le maintien de la diversité génétique d'un milieu à l'autre. Cela se manifeste par des différences dans la durée de déroulement des phases du cycle biologique allant de la germination à la production de graines.

En termes de rendement en MS, *T. isthmocarpum*, *L. ornithopodioides* et la variété Paradana de *T. michelianum* se sont montrées les plus productives suivies de *T. resupinatum* et *T. glomeratum*. Tandis que les espèces *T. arvense* et *T. campestre* se sont montrées les moins productives. Le PMG des espèces étudiées a été variable d'une espèce à l'autre. Parmi tous les écotypes, ceux de *T. isthmocarpum* originaires de la région de Chefchaouen (site 10) ont été les plus performants de point de vue PMG (3,61g par rapport à la moyenne générale 2,05). Cette région est caractérisée par la pluviométrie annuelle moyenne la plus élevée (725mm), il se peut que cette espèce préfère les régions bien arrosées ce qui se répercute sur son rendement en graines.

Pour l'espèce *L. ornithopodioides* ce sont les écotypes o18 et o20 qui ont montré une bonne production de graines (PG) avec 41,5 g en moyenne. Toutefois le PMG n'a pas dépassé en moyenne 0,98g. En comparant cette valeur à des études antérieures (Kramina, 1999 ; Cristaudo *et al.*, 2008) qui ont noté un PMG variant entre 1,2g et 3g, on constate qu'on est

loin de ces valeurs. Il s'avère que le taux élevé de déhiscence signalé chez cette espèce (Garcia de los Santos et Steiner, 2001) explique ce résultat.

La matrice de corrélation a permis de visualiser les relations établies entre les caractères morpho-agronomiques entre eux ainsi qu'avec les facteurs écologiques (altitude, latitude, longitude, pluviométrie, température et pH du sol) des sites de collecte. La pluviométrie annuelle moyenne a constitué le facteur qui influe le plus sur ces caractères étudiés. Des écotypes à floraison tardive ont correspondu à des régions humides. La PG est aussi corrélée positivement avec la pluviométrie. Contrairement à une étude antérieure de la variabilité morphologique des trèfles spontanés en Algérie (Issolah et Abdelguerfi, 2004) où la pluviométrie n'intervient pas. La corrélation positive la plus forte pour la PG a été avec le NR et la F, ce qui souligne le lien entre une maturité tardive et la capacité prolongée d'émettre des ramifications.

A la lumière de ces résultats et en se basant sur le bon rendement en MS, en PG et la précocité à la floraison, 40 écotypes des 11 espèces ont été sélectionnés pour étudier la résistance aux conditions d'irrigation saline. En effet, sous contrainte saline, un développement tardif favoriserait l'accumulation d'ions toxiques pouvant entraîner la mort des plantes avant la fin de leur cycle de développement (Munns, 2002). Ceci suggère qu'il est opportun de travailler sur des plantes à cycle court, raison sur laquelle a été basé le choix de ces 40 écotypes.

CHAPITRE 3

Étude de l'effet de la salinité sur la germination et la croissance végétative de différents écotypes de trèfle et lotier

Introduction

Les études ont mis en évidence un nombre de légumineuses fourragères susceptibles de préserver les sols et offrant la possibilité de valoriser les régions marginales affectées par la salinité. A titre d'exemple la variété Gabès (pérenne) de *Medicago sativa* L. est réputée pour sa tolérance à l'eau d'irrigation titrant 4,2 g/l de sels et sa capacité de germination en conditions de stress salin allant jusqu'à 9,5 g/l (Mezni *et al.*, 1999). On peut également citer la vesce cultivée (*Vicia sativa*, variété Commune), la luzerne annuelle *Medicago truncatula* (variété Paraggio) (Ben Younes et Gharbi, 1997) et *Trifolium alexandrium* la variété tunisienne Khadraoui (Lazrek, 2008). Pourtant, la majorité de ces études se sont focalisées sur la réponse de la plante au sel au stade végétatif. En revanche, la germination est une phase à ne pas négliger pour le choix des légumineuses fourragères annuelles. Ces dernières doivent répéter ce processus chaque année d'où l'importance de la capacité de faire germer et cultiver des semis sur des terres salines. Les travaux établis sur *Trifolium* ont montré que la concentration 200 mM de NaCl reste l'écart à partir duquel on note une diminution jusqu'à une inhibition de la germination (Rumbaugh *et al.*, 1993 ; Nichols *et al.*, 2001 ; Kumar *et al.*, 2010). Quant au genre *Lotus*, on note la performance de l'espèce *L. creticus* (Valiente *et al.*, 2007) où le pourcentage de germination reste important (80%) sur 200 mM NaCl. Toutefois, à 300 mM de NaCl la germination a été complètement inhibée (Rejili *et al.*, 2009). Des résultats préliminaires indiquent une performance de *L. ornithopodioides* (espèce de la présente étude) à la germination sur 220 mM de NaCl par rapport à *Scorpiurus subvillosus* L. (Cristaudo *et al.*, 2010). La tolérance au sel au stade germination peut être similaire ou différente de celle au stade plante adulte. En effet, l'excès de sel dans le sol ou l'eau d'irrigation peut également affecter le développement de la plante durant la phase végétative (la croissance des plantules et leur vigueur), la floraison et la fructification. A titre d'exemple, Rogers *et al.* (2009) ont constaté une réduction de la production de matière sèche d'une trentaine d'espèces de *Trifolium* sous traitement salin 160 mM. Quoique, *T. argutum*, *T. diffusum*, *T. michelianum* et *T. scabrum* ont enregistré de bons résultats sous les conditions salines avec une réduction de seulement 20% de la production de matière sèche. Les études ont notamment montré que les trèfles diffèrent dans leur capacité à limiter l'absorption des ions Na^+ et Cl^- , mais généralement leur teneur augmente dans la plante avec les niveaux de salinité (Babagolzadeh, 1998). La salinité entraîne également chez *Lotus conimembriensis* (espèce annuelle) une réduction du poids sec total des plantes traitées avec 140 mM de NaCl, tandis qu'aucun effet significatif sur la croissance n'a été observé avec 70 mM de NaCl (Sinchez-Blanco, 1998).

A partir de toutes ces études citées on constate l'intérêt d'évaluer la tolérance à la salinité sur l'ensemble du cycle de développement de la plante, d'où l'intérêt du présent travail. Ce dernier est subdivisé en deux grandes parties, les objectifs de la première partie sont :

- Caractériser l'effet de différentes concentrations salines arrivant à 220 mM sur les potentialités germinatives de 40 écotypes. Ces derniers ont été sélectionnés sur la base de leur rendement en matière sèche et de précocité de la floraison (Chapitre 2),
- Proposer un modèle de la germination des légumineuses annuelles testées pouvant coloniser des environnements pastoraux salins.

Tandis que la deuxième partie est consacrée aux :

- Suivi de la croissance sous sel des écotypes sélectionnés sur la base de leur tolérance dans la phase de germination,
- Détermination des mécanismes qui leur permettent de tolérer la salinité (ajustement osmotique, accumulation des ions...etc.),
- Identification et sélection d'écotypes à bon rendement en biomasse et pouvant s'accommoder le mieux des eaux salines et qui peuvent constituer un matériel végétal alternatif pour les zones marginales salines et leur culture sur des sols relativement riches en sels solubles. On s'intéresse particulièrement aux écotypes qui manifestent des rendements satisfaisants face à des niveaux de sels élevés.

A. Étude de l'effet de la salinité sur la germination des graines

1. Matériels et méthodes

1.1 Matériel végétal

L'étude de l'effet de la salinité sur la germination a été réalisée sur 40 écotypes de trèfle et lotier. Le choix de ces écotypes a été fait sur la base des résultats obtenus dans la présélection. Ils ont été choisis à la suite de l'essai préliminaire en plein champ conduit durant la saison 2007-2008 (Chapitre 2). Les écotypes testés sont représentés sur le tableau 11 en plus d'une variété australienne annuelle *Trifolium michelianum* Paradana connue par son bon rendement en biomasse et sa tolérance à la salinité (Craig et Beale, 1995).

1.2 Protocole de germination

Vingt graines (nombre adopté après un test de germination), de chaque écotype ont été scarifiées puis désinfectées par trempages successifs dans les bains suivants :

- Hypochlorite de sodium à 15% pendant 20 minutes
- Rinçage abondant à l'eau distillée stérile
- Alcool 90° pendant une minute

Les graines ont été ensuite mises à germer dans des boîtes de pétri sur un milieu gélosé à 1% d'agar. Les concentrations suivantes ont été adoptées: 0 mM, 70 mM, 140 mM et 220 mM de chlorure de sodium (NaCl). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement et par écotype. Les boîtes ont été mises à l'obscurité dans un incubateur réglé à 25°C avec une humidité variante de 78% à 93%. Les boîtes de pétri ont été examinées toutes les 24 heures pendant 7 jours afin de suivre la germination des graines. La germination a été repérée par l'émission de la radicule de la graine. L'effet du NaCl sur la germination a été estimé par la mesure de différents paramètres.

1.3 Mesures et observations effectuées

1.3.1 Taux de germination final

Ce paramètre constitue un meilleur moyen d'identification de la concentration saline qui présente la limite physiologique de germination des graines. Il est exprimé par le rapport nombre de graines germées sur nombre total de graines.

$$TG = (n/N) \times 100$$

n : nombre de graines germées

N : nombre total de graines mises en germination

1.3.2 Cinétique de germination

Elle permet d'appréhender la signification du comportement germinatif des écotypes étudiés ainsi que l'ensemble des événements qui commencent par l'étape cruciale d'absorption de l'eau par la graine et se terminent par l'élongation de l'axe embryonnaire et l'émergence de la radicule à travers les structures qui entourent l'embryon. Le nombre de graines germées a été noté toutes les 24 heures pendant 7 jours.

Tableau 11. Liste des écotypes étudiés et de leur origine (les caractéristiques de chaque site sont illustrées dans le Tableau 6-Chapitre 2 ; les écotypes mentionnés portent des chiffres indiquant les sites)

Espèce	Ecotype	Sites	MS (g/m²)	F (jours)
<i>T. arvense</i>	a7	S7	132	67
<i>T. bocconeii</i>	b6	S6	120	69
<i>T. campestre</i>	c4	S4	269	99
	c17	S17	235	138
<i>T. cherleri</i>	ch5	S5	299	90
	ch19	S19	350	97
	ch20	S20	406	95
<i>T. glomeratum</i>	g2	S2	556	100
	g4	S4	318	106
	g14	S14	500	90
	g15	S15	654	90
<i>T. isthmocarpum</i>	i1	S1	780	70
	i2	S2	630	68
	i3	S3	890	79
	i4	S4	1000	90
	i6	S6	1060	99
	i7	S7	1108	85
	i8	S8	1110	88
	i10	S10	1120	79
	i11	S11	1200	80
	i12	S12	1200	80
<i>T. resupinatum</i>	i19	S19	1225	110
	r4	S4	589	71
	r5	S5	690	100
	r7	S7	899	87
	r8	S8	412	100
<i>T. scabrum</i>	r12	S12	817	125
	sc1	S1	188	90
	sc2	S2	179	90
<i>T. stellatum</i>	sc3	S3	191	73
	st7	S7	89	70
<i>T. tomentosum</i>	st8	S8	203	101
	t3	S3	440	80
	t8	S8	476	88
	t10	S10	200	100
<i>L. ornithopodioides</i>	t12	S12	480	70
	o8	S8	856	110
	o9	S9	904	110
	o10	S10	845	110
<i>T. michelianum</i>	o16	S16	900	79
	Paradana (variété témoin)			

1.3.3 Moyenne de germination journalière

Elle est le rapport entre le pourcentage de germination finale et le nombre de jours à la germination finale désigné par MDG « Mean Daily Germination » (Osborne et Nercer, 1993).

1.3.4 Réversibilité de l'action du sel

Ce paramètre a l'avantage de déterminer l'origine de l'effet dépressif du sel s'il est de nature osmotique et/ou toxique. Ainsi, les 20 graines de chaque écotype qui ont été mises à germer en présence de 140 mM et 220 mM de NaCl pendant 7 jours ont été utilisées. Parmi ces graines on a choisit celles non germées. Elles ont été rincées trois fois pour éliminer le sel non absorbé puis transférées sur milieu contenant l'eau distillée pendant vingt jours supplémentaires. Le pourcentage de la reprise de germination a été déterminé par la formule suivante : $RG = [(a-b / (c-b))] \times 100$ où a est le nombre total des graines germées après le transfert sur l'eau distillée, b est le nombre total des graines germées sur solution saline et c est le nombre total de graines mises en germination.

1.3.5 Toxicité des ions et des effets osmotiques sur la germination

Cette expérience vise à prouver si la sensibilité au NaCl à la germination déterminée par la réversibilité est attribuée à des effets osmotiques ou à la toxicité des ions. Les traitements ont consisté à mettre 20 graines de l'écotype de chaque espèce (ayant montré une faible ou nulle germination sur milieu très salin 220 mM), sur un milieu additionné à 10 ml de: (a) 0 mM de NaCl; (b) 220 mM de NaCl et (c) 380 mM de mannitol (potentiel osmotique similaire à 220 mM de NaCl). Chaque traitement contient aussi une base 5 mM CaSO₄. L'incubation a duré 20 jours.

1.3.6 Concentrations de Na⁺ et K⁺ dans les graines

Les réponses des graines à des concentrations croissantes de NaCl vis-à-vis de leurs teneurs en ions Na⁺ et K⁺ ont été examinées pour des graines dures et d'autres imbibées de chaque écotype. Pour cette raison aucun traitement préalable n'a été réalisé sur les graines utilisées dans cette expérience, notamment la scarification. L'objectif est d'évaluer le pourcentage de graines dures et non dures pour chaque écotype, ainsi tester le comportement de la graine via la pénétration des ions sous traitement salin. En conséquence déterminer comment le tégument dur protège la graine contre la toxicité des ions salins. Vingt graines de

chaque écotype ont été incubées dans des solutions de 0 mM, 140 mM ou 220 mM de NaCl, chacune a également contenu une base 5 mM CaSO₄ pendant 20 jours. Les graines ont été enlevées de boîtes de Pétri, lavées 3 fois pendant 30 secondes avec des solutions iso-osmotiques de mannitol et séchées. Les échantillons séchés à l'étuve ont été broyés au mortier. Ensuite les ions ont été extraits dans 10 ml de 0,5 M HNO₃ en agitant pendant 48 h à 20-25 °C. Na⁺ et K⁺ ont été déterminées dans des dilutions des extraits en utilisant un photomètre à flamme (PFP7, Jenway, Essex) (Boschma *et al.*, 2008). Sachant que les graines considérées dures ont été celles qui ne se sont pas gonflées après l'incubation (elles ne se compriment pas quand on les tapote légèrement à l'aide d'une pince), contrairement aux imbibées qui se sont gonflées après la germination dans la solution.

1.3.7 Analyses statistiques

Le programme Systèmes d'Analyses Statistiques (SAS, Inc., Cary, North Carolina, USA) a été utilisé pour réaliser les analyses de la variance et la comparaison des moyennes. La comparaison des moyennes a été réalisée par le test L.S.D au seuil de probabilité 5%.

2. Résultats

2.1 Evolution du taux de germination final en fonction de la salinité

Le taux de germination a diminué en fonction des concentrations croissantes de NaCl. L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif ($P < 0,001$) de l'interaction écotype x concentration saline: (Tableau 12).

- A la concentration 70 mM de NaCl, la capacité germinative pour la plupart des écotypes n'a pas été affectée et les valeurs enregistrées sont statistiquement plus ou moins proches des valeurs obtenues chez les plantes témoins (0 mM NaCl). Cependant pour les écotypes c4, g14, r5, r7, r12 et st8, le taux de germination s'est montré affecté par le sel. On constate que les pourcentages de germination de ces écotypes ont diminué par rapport à leurs témoins de plus de 40% en moyenne.
- A la concentration 140 mM de NaCl, seuls les écotypes ch5, ch19, ch20, i1, i2 et o9 ont gardé un taux de germination final relativement élevé qui est en moyenne de 87%. Pour les autres écotypes, le pourcentage des graines germées a baissé au niveau de ce traitement.

- A 220 mM de NaCl, les valeurs des taux de germination sont plus faibles. Dans ce traitement l'effet dépressif du NaCl apparaît nettement, avec un retard et une diminution très prononcés de la germination. Le taux de germination de la plupart des écotypes n'a pas dépassé 25%. Seuls les écotypes ch5, ch19, ch20, i2, i3, sc1, sc3 et o9 ont eu un taux de germination finale en moyenne de 50%.

En utilisant la comparaison des moyennes des différents écotypes (Tableau 12), ces derniers peuvent être classés en quatre groupes à réaction différente vis-à-vis du NaCl:

- Le premier, renferme les écotypes ch5, ch19, ch20 de l'espèce *T. cherleri*, qui a le taux de germination le plus élevé de 85%. Il ne manifeste qu'une faible réduction, par rapport aux témoins (0 mM), de 3% pour une concentration de 70 mM, 10% pour une concentration de 140 mM de NaCl et 40% pour 220 mM ; c'est un groupe qui peut être qualifié de très tolérant.
- Le deuxième groupe est constitué par les écotypes g4, i1, i2, i3, i4, i10, sc1, sc3, o9 et o16 représentant des taux de germination rapprochés avec une moyenne de 73%. Ce groupe est considéré comme tolérant. La variété Paradana en fait partie.
- Le troisième groupe représente les écotypes c4, c17, g2, g15, i6, i7, i12, i19, st8, t3, t8, o8 et o10 qui ont une capacité germinative moyenne faible de 60%. Il s'agit d'un groupe sensible.
- Le quatrième groupe est constitué des écotypes a7, b6, g14, i8, i11, r4, r5, r7, r8, r12, sc2, st7, t10 et t12 avec un taux de germination inférieur à 50% (47% en moyenne). Il s'agit d'un groupe très sensible.

De point de vue interspécifique (Tableau 13), les douze espèces diffèrent significativement ($P < 0,001$) dans leur germination à des concentrations croissantes de NaCl. *T. arvense*, *T. bocconeii*, *T. campestre*, *T. glomeratum*, *T. resupinatum*, *T. stellatum* et *T. tomentosum*, ont tous eu des réductions significatives ($P < 0,001$) du pourcentage de germination dès la concentration 70 mM de NaCl. *T. isthmocarpum*, *T. scabrum* et *L. ornithopodioides* ainsi que la variété témoin Paradana n'ont eu aucune diminution significative du taux de germination jusqu'à 140 mM de NaCl, mais ont connu une diminution significative ($P < 0,001$) au dessus de cette concentration. A 220 mM NaCl leurs taux de germination ont été de 25% en moyenne. *T. cherleri* est l'espèce la plus tolérante à la salinité, avec un taux de germination de 89% à 140 mM de NaCl n'étant pas différent

significativement de celui observé à 70 mM de NaCl, et un taux de germination finale supérieur à 50% à 220 mM de NaCl.

Tableau 12. Variation de la capacité germinative (%) des écotypes pour les différentes concentrations de NaCl (mM). Les valeurs d'une même ligne suivies de la même lettre ainsi que la colonne des moyennes ne diffèrent pas au seuil de 5% selon le test de L.S.D

Espèce	Ecotype	NaCl (mM)				Moyenne
		0	70	140	220	
<i>T. arvense</i>	a7	81,7a	63,3a	31b	19,6c	51c±1,4
<i>T. bocconeii</i>	b6	90a	77a	29,3b	11c	51c±5,4
<i>T. campestre</i>	c4	89a	57b	30c	18d	58c±8,3
	c17	94a	66,7b	55,9c	10d	56c±12,1
<i>T. cherleri</i>	ch5	100a	96,6a	89,7a	57b	86a±19
	ch19	100a	97,2a	90,9a	53b	85a±2,1
	ch20	100a	96,5a	91,7a	54b	86a±3,2
<i>T. glomeratum</i>	g2	85a	70,7a	64,3b	23c	60c±9,5
	g4	98,3a	90a	64,3b	16,3c	67c±7,5
	g14	100a	56,7b	38,3c	1,7d	49d±7,1
	g15	80a	71,7a	53,3b	3,3c	52d±10
<i>T. isthmocarpum</i>	i1	95a	86,7a	84,3a	27b	73b±2,3
	i2	95a	87,6a	86,7a	50b	79b±4,2
	i3	83,3a	75a	72,6a	41,3b	68b±5,7
	i4	100a	90a	33,3b	27c	63c±8,7
	i6	100a	91,7a	73,3b	22c	72b±5
	i7	100a	97a	50b	18,6c	66c±6,5
	i8	100a	71,7b	13,3c	1,2d	41d±9,4
	i10	95a	86,7a	68,3b	37c	72b±10
	i11	100a	77b	15c	3,3d	46d±14,4
	i12	100a	100a	36,7b	25,3c	65c±9,7
	i19	100a	100a	40b	18,6c	65c±8,6
<i>T. resupinatum</i>	r4	86,7a	78,3a	26b	14,6c	51c±6,6
	r5	100a	38,6b	25c	18d	45d±4,4
	r7	100a	41,7b	22,2c	12d	47d±10
	r8	100a	54,9b	33,3c	20c	52d±10,6
	r12	100a	50b	31,7c	3,3d	46d±8,7
<i>T. scabrum</i>	sc1	100a	91,7a	73,3b	56b	74b±7
	sc2	100a	41,7b	23,3c	18d	46d±1,6
	sc3	100a	91,7a	73,3b	59,6b	79b±10
<i>T. stellatum</i>	st7	70a	67a	25b	6c	42d±19,5
	st8	99,4a	38b	25c	13,6d	44c±7,7
<i>T. tomentosum</i>	t3	90a	81,7a	30,2b	18,6d	55b±13,5
	t8	91,7a	83,3a	69,3b	21c	68b±8,5
	t10	78,3a	50,7b	49,3b	11,6c	45d±2,3
	t12	76,7a	60,3b	30,6c	20,3d	46d±12
<i>L. ornithopodioides</i>	o8	100a	77,6b	36,7c	25,3d	60c±6,6
	o9	92a	81,7a	81a	48b	75b±4,2
	o10	100a	92,9a	33,3b	22c	62c±15,7
	o16	100a	97,7a	73,3b	32c	73b±2,3
<i>T. michelianum</i>	Paradana	100a	98a	86a	28,7c	74b±4,4
L.S.D		11,2	7,9	12,4	5,6	

Tableau 13. Variation de la capacité germinative des espèces pour les différentes concentrations de NaCl (mM). Les valeurs d'une même ligne suivies de la même lettre ne diffèrent pas au seuil de 5% selon le test de L.S.D

Espèce	NaCl (mM)			
	0	70	140	220
<i>T. arvense</i>	81,7a	63,3b	31c	19,6d
<i>T. bocconeii</i>	90a	77b	29,3c	11d
<i>T. campestre</i>	91,5a	61,85b	42,95c	14d
<i>T. cherleri</i>	100a	96,8a	90,8a	54,7b
<i>T. glomeratum</i>	90,8a	72,3b	40,1c	11,1d
<i>T. isthmocarpum</i>	100a	87,5a	72,2b	24,7c
<i>T. resupinatum</i>	97,3a	52,7b	27,6c	13,6d
<i>T. scabrum</i>	100a	75,0a	56,6b	44,5d
<i>T. stellatum</i>	84,7a	68,0b	45,0c	9,8d
<i>T. tomentosum</i>	84,2a	69,0b	47,4c	17,9d
<i>L. ornithopodioides</i>	98,0a	87,5a	56,1b	31,8c
<i>T. michelianum</i> (Paradana)	100a	98a	76,0b	11,7c
L.S.D	7,5	10,2	6,3	5,68

2.2 Cinétique de germination

La figure 7 montre l'effet des différentes concentrations de NaCl sur l'évolution du taux de germination des écotypes au cours du temps après 7 jours du traitement salin. Les courbes de germination permettent de distinguer 3 phases:

- une phase de latence, nécessaire à l'apparition des premières germinations, au cours de laquelle le taux de germination reste faible. La durée de cette phase est variable selon la concentration de NaCl. Elle est courte, de l'ordre de 24 heures, chez la plupart des plantes témoins et certains écotypes cultivés à la concentration 70 mM de NaCl. Mais, elle devient plus ou moins longue, surtout pour les plantes soumises au traitement 220 mM de NaCl où cette phase peut aller jusqu'à 36 heures;
- une phase sensiblement linéaire, correspondant à une augmentation rapide du taux de germination qui évolue proportionnellement au temps, au moins pour les plantes témoins et les plantes soumises aux concentrations inférieures à 140 mM;
- une troisième phase correspondant à un palier représentant le pourcentage final de germination et traduisant la capacité germinative dans les conditions de l'expérience.

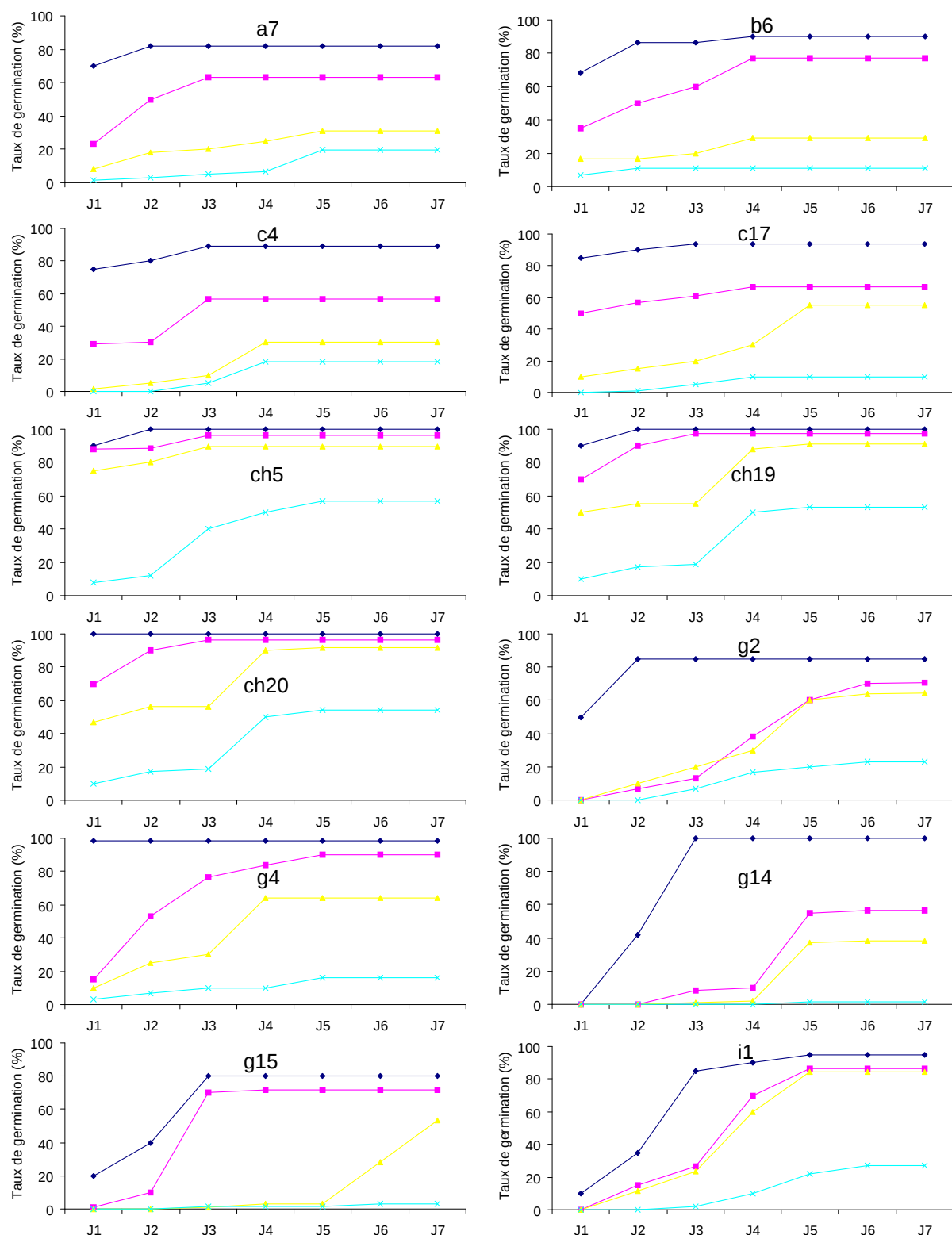


Figure 7. Effets de NaCl (C1 0 mM, C2 70 mM, C3 140 mM, C4 220mM) sur la cinétique de germination des graines de 40 écotypes et de la variété Paradana mises à l'obscurité, à température constante 26 °C et une humidité relative variante de 78% à 93%. —◆— C1 —■— C2 —▲— C3 —×— C4

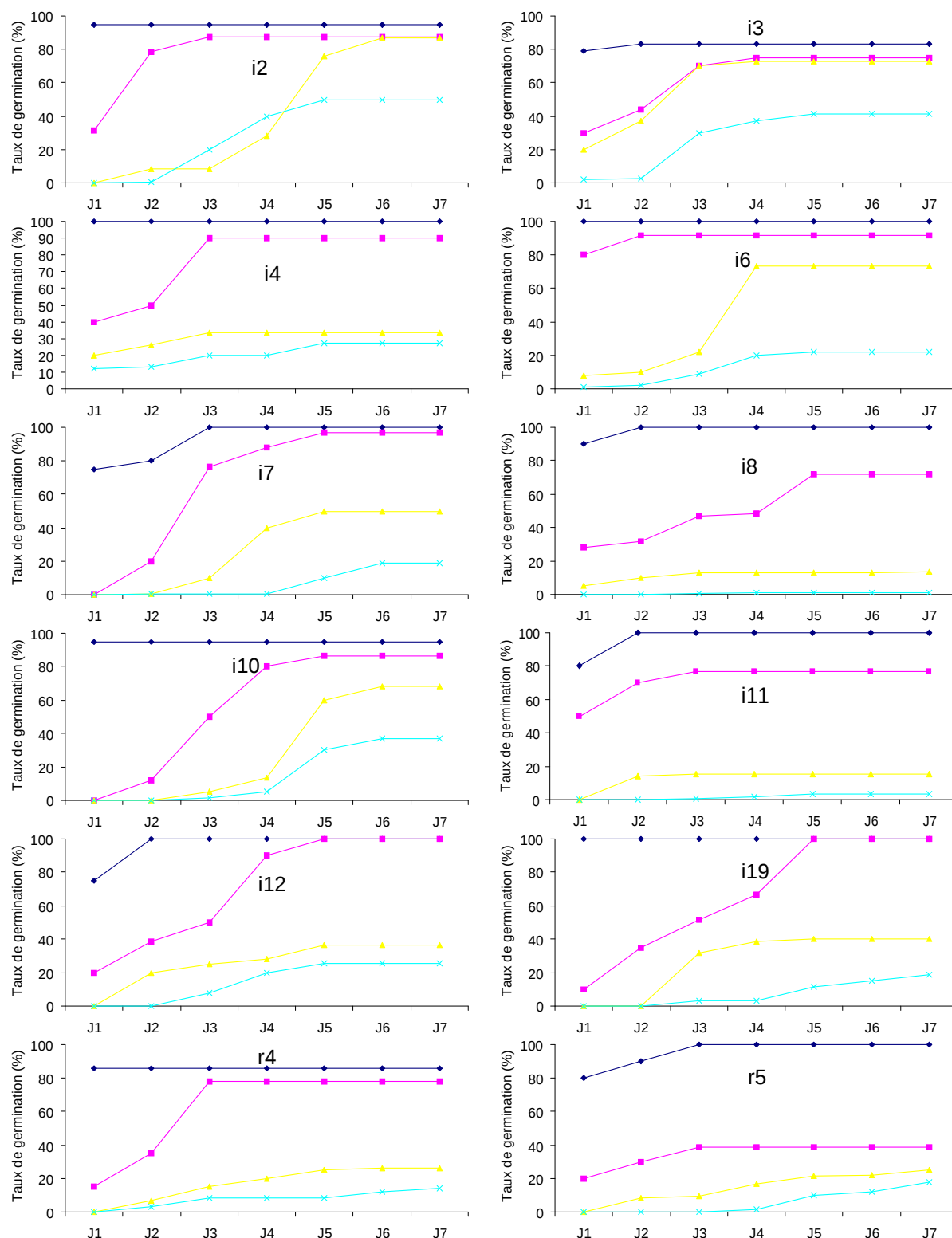


Figure 7 (suite). Effets de NaCl (C1 0 mM, C2 70 mM, C3 140 mM, C4 220mM) sur la cinétique de germination des graines de 40 écotypes et de la variété Paradana mises à l'obscurité, à température constante 26 °C et une humidité relative variante de 78% à 93%. —●— C1 —■— C2 —▲— C3 —×— C4

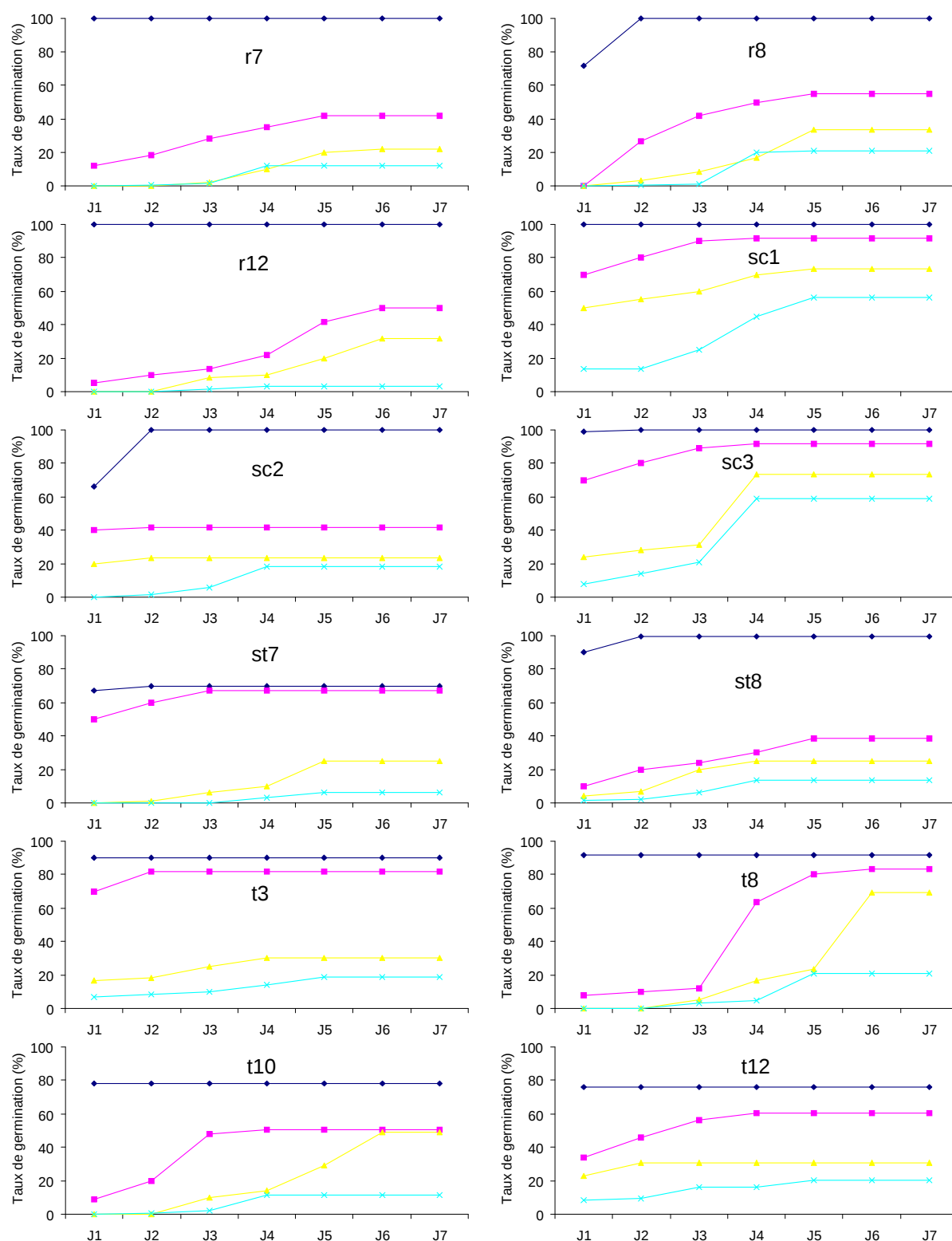


Figure 7 (suite). Effets de NaCl (C1 0 mM, C2 70 mM, C3 140 mM, C4 220mM) sur la cinétique de germination des graines de 40 écotypes et de la variété Paradana mises à l'obscurité, à température constante 26 °C et une humidité relative variante de 78% à 93%. —◆— C1 —■— C2 —▲— C3 —×— C4

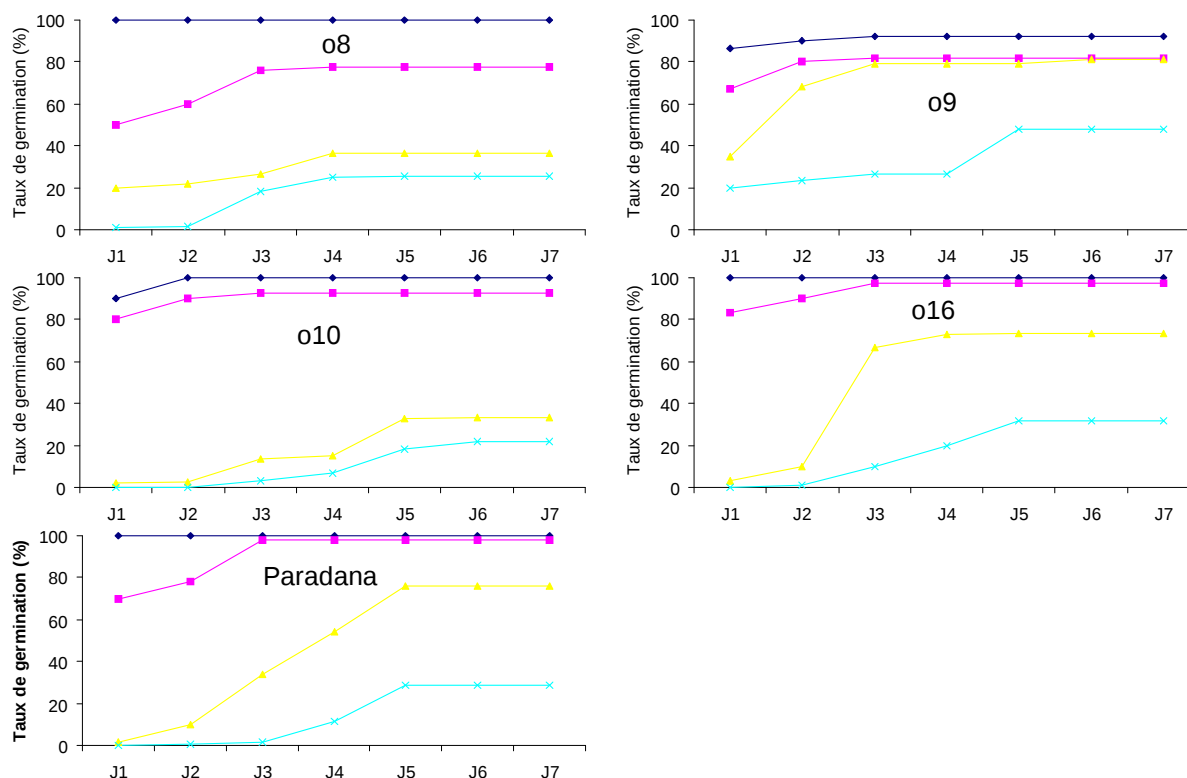


Figure 7 (suite). Effets de NaCl (C1 0 mM, C2 70 mM, C3 140 mM, C4 220mM) sur la cinétique de germination des graines de 40 écotypes et de la variété Paradana mises à l'obscurité, à température constante 26 °C et une humidité relative variante de 78% à 93%. —◆— C1 —■— C2 —▲— C3 —×— C4

Le nombre de graines germées en fonction du temps sur milieu témoin (0 mM NaCl) des écotypes ch20, g4, i2, i4, i6, i10, i19, r4, r7, r12, sc1, sc3, t3, t8, o8, o16 et la variété Paradana a été plus important et a évolué plus rapidement que celui des autres. Cependant, l'évolution la plus lente du taux de germination a été observée chez les écotypes b6, c4, g14, g15, i1 et i7. Pour tous les traitements salins, les écotypes à lente cinétique de germination sont : g4, i10, i19, r4, r7, r12, t3 et t8. Toutefois, Paradana fait partie de ceux ayant une germination lente sur milieu très salin (220 mM). Le reste des écotypes ont eu un comportement intermédiaire. D'autre part, dans le milieu non salin, le taux de germination atteint son maximum au bout de 1 à 2 jours en moyenne avec des valeurs comprises entre 80 et 100%. Dans le milieu 70 mM de NaCl la majorité des écotypes atteignent un taux final de germination voisin ou similaire à celui des témoins, sauf que le temps de germination est rallongé. Tandis que sous stress salin sévère la durée d'atteindre le taux final de germination a été beaucoup plus longue.

2.3 Moyenne de germination journalière

Les valeurs des moyennes de germination journalière (MDG) des écotypes étudiés sont rapportées sur la figure 8. Sur milieu non salin (0 mM) se manifestent deux groupes

d'écotypes. Un groupe constitué par les écotypes à forte MDG entre 80 % et 100%. Ce groupe renferme les écotypes ch20, g4, i4, i6, i10, i19, r7, r12, sc1, t8, t10, o8, o16 et Paradana. Le deuxième est formé par des écotypes à MDG moins importante. A des concentrations de sel qui dépasse 70 mM, ce paramètre devient faible et variable en fonction des écotypes. Au traitement 220 mM, les valeurs les plus élevées sont gardées par les écotypes de l'espèce *T. cherleri*; suivis par les écotypes de *T. isthmocarpum* i1, i2 et i3; les écotypes sc1 et sc3 de l'espèce *T. scabrum* et enfin l'écotype o9 de *L. ornithopodioides* et elles varient entre 8,3% et 14,75%. Tandis que les MDG les plus faibles sont enregistrées chez les écotypes g14 et g15 de l'espèce *T. glomeratum*; i11, r7 et t12 des espèces *T. isthmocarpum*, *T. resupinatum* et *T. tomentosum* qui varient entre 0,27% et 0,8%. La variété Paradana montre une bonne MDG sur des concentrations salines moyennes de l'ordre de 40%. Tandis qu'elle fait partie de ceux sensibles aux concentrations élevées en NaCl (220 mM) avec une MDG très faible de 3%.

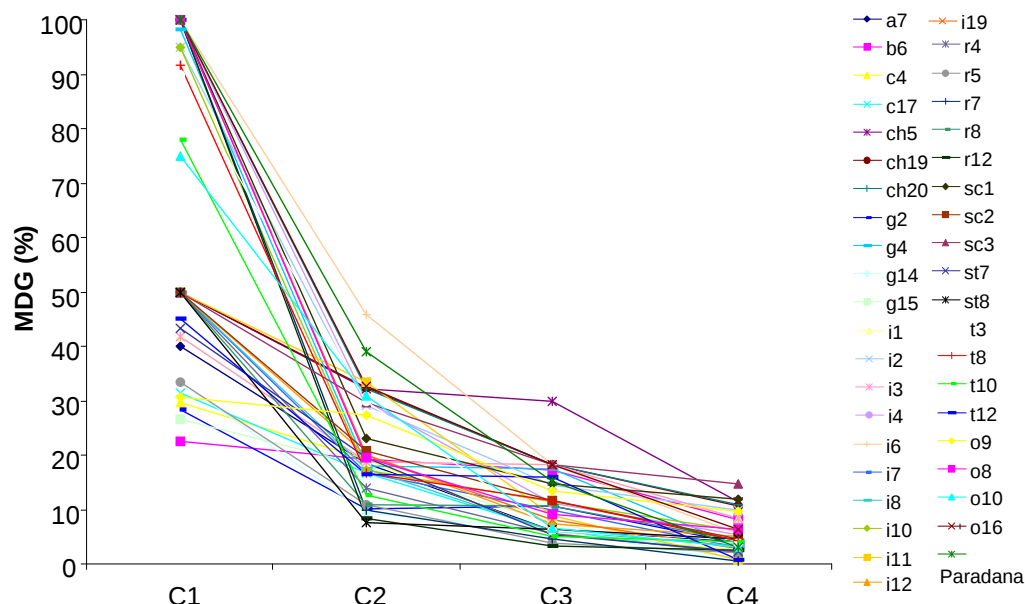


Figure 8. Variation de la moyenne du taux de germination journalière (MDG) de 40 écotypes et de la variété Paradana en fonction de la concentration en NaCl: C1 (0 mM) ; C2 (70 mM) ; C3 (140 mM) et C4 (220 mM). Les graines sont mises à l'obscurité, à température constante 26°C et une humidité relative variante de 78% à 93%

2.4 Réversibilité de l'inhibition de la germination

Il a été démontré dans les paragraphes précédents que le sel exerce, à fortes doses (140 mM et 220 mM), un effet dépressif sur la germination des graines. Cette inhibition peut être osmotique et/ou toxique. Dans la mesure où elle est d'origine osmotique, on devrait s'attendre à une reprise de la germination après levée de cette contrainte. Par contre, si des phénomènes de toxicité ionique interviennent, on peut prévoir l'absence de cette reprise de germination. La

figure 9 représente le taux de germination des graines des écotypes étudiés, soit directement sur milieu contenant de l'eau distillée, soit sur ce même milieu, mais après un prétraitement avec du chlorure de sodium aux doses 140 mM et 220 mM. Pour ces deux dernières concentrations et pour certains écotypes, le transfert des graines dans de l'eau distillée a été suivi d'une reprise de la germination (RG). Cette dernière varie avec l'écotype et la concentration saline du prétraitement appliqué ($p < 0,01$). La reprise a été remarquable pour les écotypes r8, sc1, sc2, sc3, o8, o9 et la majorité d'écotypes de *T. isthmocarpum*. Néanmoins, la capacité germinative reste plus faible que celle obtenue pour les graines mises directement sur milieu non salin. De plus, les graines prétraitées par 140 mM NaCl puis transférées dans l'eau distillée, ont mieux repris que celles prétraitées par 220 mM NaCl. On a particulièrement noté une absence de reprise de germination pour les écotypes a7, c4, g2, g14, i8, st7, st8, t3, t8 et t10 quelque soit le prétraitement salin. Tandis que les reprises de germination les plus faibles sont obtenus par l'écotype b6 avec 29% sur le prétraitement 140 mM et c17 avec 10% sur le prétraitement 220 mM de NaCl. Ils sont suivis par ch5, ch19 et ch20. La variété Paradana a également montré une faible reprise de germination après prétraitement 220 mM de NaCl avec un taux de l'ordre de 21%.

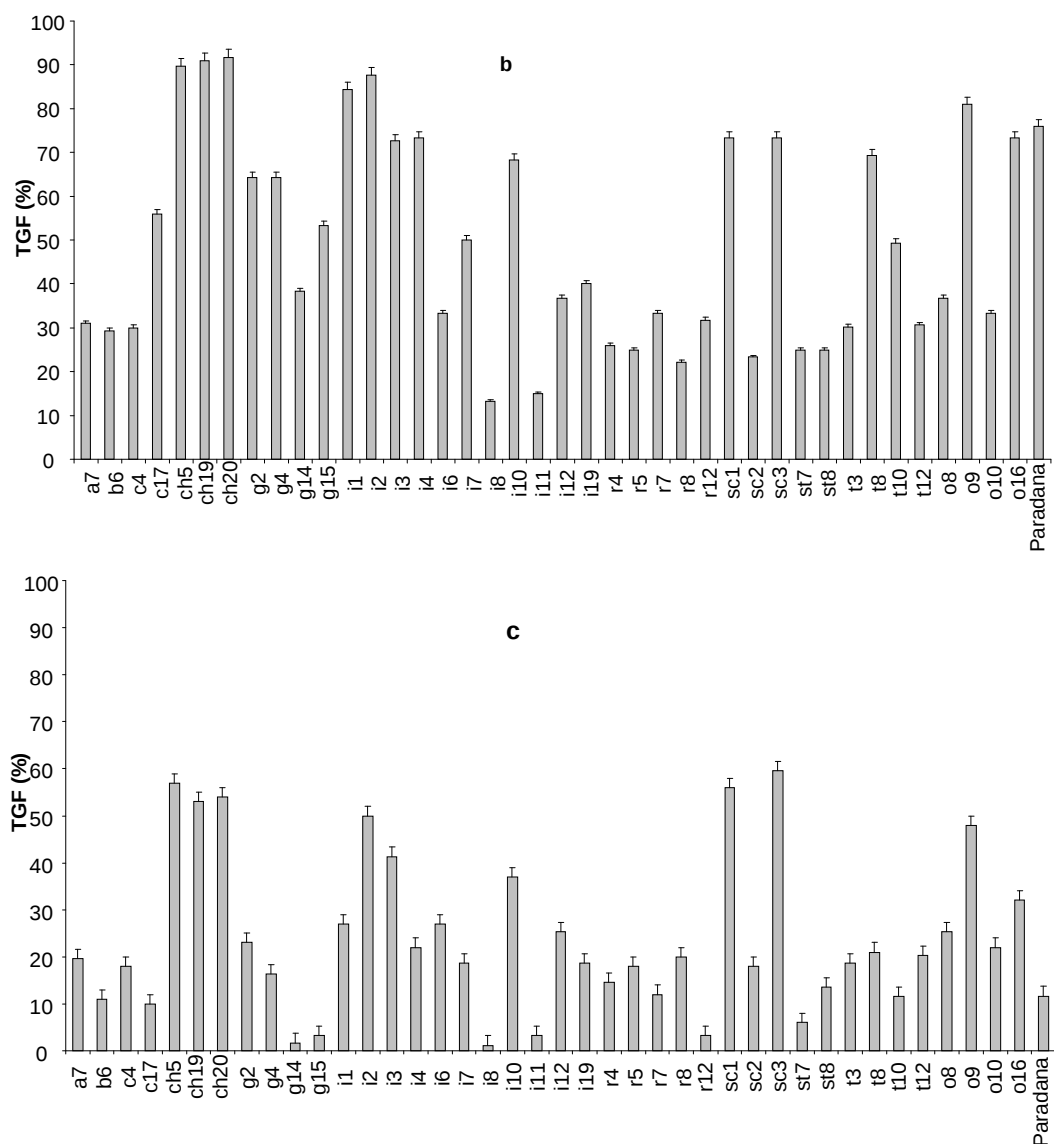


Figure 9. Reprise de germination (RG) sur l'eau distillée après un prétraitement avec du chlorure de sodium 140 mM (a) et 220 mM (b) à l'obscurité, à température constante 26°C

2.5 Détermination de la toxicité des ions et des effets osmotiques sur la germination

Pour mieux prouver l'effet osmotique ou toxique du NaCl sur les espèces, on a eu recours à comparer le comportement germinatif sur NaCl et sur du mannitol. Pour cela on a choisi pour chaque espèce l'écotype ayant montré un très faible taux de germination final sur milieu 220 mM. Les potentiels osmotiques calculés pour chaque solution sont: 0 MPa sur 0 mM de NaCl, -1,31 MPa sur 220 mM de NaCl et -1,55 MPa sur 380 mM de mannitol (solution iso-osmotique). L'interaction écotipe x mannitol a été significative ($p < 0,001$). Les pourcentages de germination de tous les écotypes à 380 mM de mannitol ont été plus élevés que ceux enregistrés dans 220 mM de NaCl (Figure 10), indiquant les éventuels effets toxiques des ions NaCl à cette concentration. En effet, l'effet toxique de NaCl a apparu nettement chez les

écotypes c4, g2, g14, st7 et t10 vu leur taux élevés de germination sur le mannitol (380 mM) par rapport à la concentration 220 mM de NaCl. La variété Paradana a également montré un taux de germination élevé sur 380 mM de Mannitol.

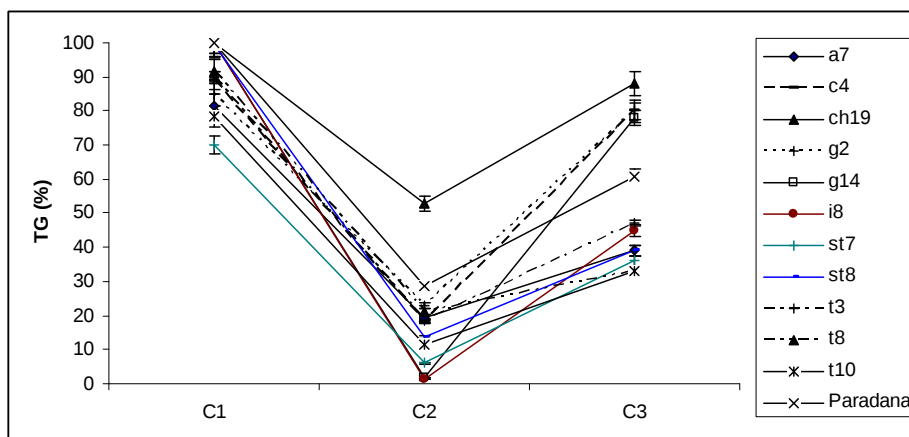


Figure 10. Taux de germination des écotypes (TG %) –à taux de germination faible à nul sur 220 mM de chaque espèce– sur les milieux C1 (0mM) ; C2 (220 mM NaCl) et C3 (380 mannitol) après 20 jours d'incubation

2.6 Concentrations des ions Na^+ et K^+ dans les graines

On a constaté la non germination des graines dures face à la germination d'un certain pourcentage de graines imbibées. Toutefois, le traitement salin n'a pas affecté la proportion de l'imbibition pour n'importe quel écotpe (Annexe 2). Par contre, le pourcentage des graines imbibées diffère selon les espèces ainsi selon les écotypes, jugeant l'importance du nombre de graines dures d'un écotpe à l'autre. Quant aux concentrations des ions Na^+ et K^+ enregistrées, elles indiquent que l'absorption de la solution saline a été importante chez les graines imbibées que celles dures et ceci pour toutes les espèces. La concentration de Na^+ a augmenté avec l'intensité du traitement salin aussi bien dans les graines dures que les imbibées. Cependant, les valeurs des concentrations de Na^+ enregistrées chez les graines dures ont été plus faibles que celles des graines imbibées et ceci pour tous les niveaux de traitement (Tableau 14), avec une différence significative entre les écotypes ($P < 0,001$). Ce sont les écotypes de *T. cherleri* qui ont montré l'importante augmentation des teneurs en Na^+ (22% sur 220 mM NaCl par rapport à 0 mM). Ils sont suivis par les écotypes a7 et b6 (*T. arvense* et *T. campestre*). Par contre, la concentration des ions K^+ a diminué dans les graines imbibées avec les concentrations croissantes de NaCl, sauf pour les écotypes i1, i2, i3, i6, i10 et i12 de l'espèce *T. isthmocarpum*, et o9 et o16 de l'espèce *L. ornithopodioides*. Toutefois, les graines dures contiennent des concentrations en K^+ plus élevées que celles des graines imbibées.

Tableau 14. Concentrations des ions Na⁺ et K⁺ (μmol g⁻¹ de matière sèche) des graines imbibées et dures dans 0 mM, 140 mM et 220 mM de NaCl

Espèce	Ecotype	Graines imbibées						Graines dures					
		K ⁺			Na ⁺			K ⁺			Na ⁺		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>T. arvense</i>	a7	166	70	50	67	567	1290	281	185	165	68	76	90
<i>T. bocconeii</i>	b6	120	90	70	60	600	1331	135	143	185	78	82	89
<i>T. campestre</i>	c4	150	110	84	57	623	870	165	225	199	120	17	20
	c17	154	110	89	50	600	855	169	225	204	120	17	17
<i>T. cherleri</i>	ch5	144	127	104	30	520	706	242	259	155	117	113	113
	ch19	149	140	138	28	500	700	253	255	164	80	90	90
	ch20	149	140	130	28	590	700	245	255	194	82	90	90
<i>T. glomeratum</i>	g2	142	123	84	45	565	760	257	238	199	70	80	88
	g4	160	77	50	67	570	990	275	192	165	66	72	89
	g14	156	120	80	45	540	780	271	235	195	70	79	80
	g15	150	120	80	48	540	812	265	235	195	70	78	80
<i>T. isthmocarpum</i>	i1	127	140	150	27	390	689	242	255	265	18	12	14
	i2	120	148	150	28	402	680	235	263	265	16	13	13
	i3	122	139	137	40	500	830	237	254	252	23	27	70
	i4	140	120	97	27	500	700	245	242	249	21	30	45
	i6	130	129	134	30	467	768	255	235	212	33	30	30
	i7	130	120	90	33	440	698	266	264	255	37	30	40
	i8	140	120	97	34	400	706	255	271	270	37	40	44
	i10	140	156	155	40	400	823	255	235	212	40	41	44
	i11	137	120	90	40	400	821	252	235	205	32	40	44
	i12	151	149	140	40	400	800	245	235	205	44	40	44
<i>T. resupinatum</i>	i19	130	133	90	42	400	800	245	248	205	40	52	47
	r4	167	70	50	66	560	1000	282	185	165	65	70	91
	r5	160	77	50	60	570	990	275	192	165	66	72	89
	r7	132	50	34	58	623	930	247	165	149	76	84	88
	r8	169	54	30	54	620	945	284	169	145	78	85	90
<i>T. scabrum</i>	r12	151	68	22	57	620	923	266	183	137	70	84	89
	sc1	150	50	30	54	618	900	265	165	145	70	84	77
	sc2	150	55	37	54	600	900	265	170	152	70	84	77
<i>T. stellatum</i>	sc3	129	57	40	61	576	1023	244	172	155	86	90	91
	st7	134	90	44	67	578	1000	149	184	159	90	90	90
	st8	130	90	44	67	578	1000	145	183	159	86	90	93
<i>T. tomentosum</i>	t3	170	50	28	62	432	900	285	165	143	71	87	78
	t8	165	51	20	62	444	990	280	166	135	76	80	80
	t10	166	50	20	60	412	987	281	165	135	76	80	90
	t12	157	70	47	60	400	956	272	185	162	76	80	92
<i>L. ornithopodioides</i>	o8	128	136	138	40	500	712	243	221	223	36	18	18
	o9	122	136	150	43	500	705	245	238	265	37	20	17
	o10	130	123	99	38	510	700	237	211	214	36	26	27
	o16	124	136	140	38	480	700	239	251	255	37	23	23
<i>T. michelianum</i>	Paradana	166	123	86	67	420	944	183	190	201	77	82	90
L.S.D		0,09	1,74	0,14	1,82	0,05	2,75	0,31	3,5	2,1	1,7	1,3	1,45

3. Discussion

3.1 La tolérance au sel durant la germination

Les résultats ont montré que ni la capacité germinative, ni la vitesse de germination n'ont été affectées par le sel à la concentration 70 mM de NaCl, et ceci pour la majorité des écotypes testés. C'est à partir de la concentration 140 mM NaCl qu'on a commencé à observer une discrimination significative des écotypes en fonction de leur tolérance à la salinité, beaucoup plus importante dans 220 mM de NaCl. La diminution du taux de germination final avec l'augmentation de la concentration saline correspond soit à une augmentation de la pression osmotique externe, ce qui affecte l'absorption de l'eau par les graines et/ou à une accumulation des ions Na^+ et Cl^- dans l'embryon (Mwale *et al.*, 2003). Cet effet toxique peut conduire à l'altération des processus métaboliques de la germination et dans le cas extrême à la mort de l'embryon par excès d'ions. Tandis que le retard de la germination des graines ainsi que la diminution de la moyenne de germination journalière de l'ensemble des écotypes avec la concentration en NaCl sont expliqués par le temps nécessaire à la graine de mettre en place des mécanismes lui permettant d'ajuster sa pression osmotique interne.

Les résultats indiquent également que certains écotypes de *T. isthmocarpum*, *T. cherleri* et *L. ornithopodioides* ont arrivé à germer aux plus fortes concentrations de NaCl avec une diminution du taux de germination de 50% par rapport à leurs témoins (0 mM). *T. cherleri* a été signalée comme étant une espèce tolérante à des concentrations modérées de NaCl (Rogers *et al.*, 2006). Du même *L. ornithopodioides* a été prélevée sur des sites salins dans plusieurs études australiennes (Nichols *et al.*, 2007). Tandis que la tolérance de *T. isthmocarpum* à la salinité durant la phase de la germination reste un résultat intéressant vu que sont rares les études qui ont traité cette espèce vis-à-vis de la salinité. En outre, les espèces *T. isthmocarpum*, *T. cherleri* et *L. ornithopodioides* n'ont enregistré aucune différence du taux de germination sur 140 mM NaCl par rapport à la variété Paradana. En revanche, sur 220 mM elles ont montré des taux de germination élevés à celui de Paradana ($p < 0,01$) ce qui prouve la supériorité des écotypes autochtones par rapport aux variétés commerciales.

Cette étude a révélé la très faible tolérance à la salinité de *T. tomentosum*, *T. resupinatum*, *T. arvense*, *T. stellatum* et *T. campestre* probablement d'ordre hormonal. En effet l'acide gibbérellique (GA) joue un rôle clé dans la germination. Jung et Park (2011) ont démontré sur

Arabidopsis thaliana la présence d'un facteur de transcription NTL8 dont l'expression est induite par le paclobutrazol (inhibiteur de la biosynthèse de GA et médiateur dans la régulation de la germination indépendamment de l'ABA) et qu'il réprime le gène GA 3-oxydase 1. Ils ont notamment constaté que l'induction de NTL8 est élevée sous forte salinité. Ce qui appuie l'hypothèse que les signaux de sel inhibent la germination des graines en réprimant la biosynthèse de GA par NTL8. La faible tolérance de ces espèces peut aussi être expliquée par leur inaptitude de mettre des mécanismes qui leur permettent de mobiliser les réserves de la graine en présence de sel. En effet la germination demande la mobilisation des réserves de la graine qui sont majoritairement de nature glucidique chez les légumineuses. Cette mobilisation dépend de l'activation des enzymes hydrolytiques. L'enzyme responsable est l' α -amylase qui hydrolyse les glucides en sucres solubles et qui seront soumises à la graine pour les besoins de sa croissance. L'effet de NaCl peut s'exercer sur l'activité enzymatique elle-même tel a été signalé par Khalid *et al.* (2004) chez le pois chiche. Ou bien elle peut s'exercer sur le transport des produits de l'hydrolyse des réserves vers l'embryon. Les niveaux de tolérance à la salinité dans cette étude sont généralement en accord avec d'autres travaux. Auda *et al.* (2010), n'a trouvé aucune réduction du pourcentage de germination pour *T. cherleri* dans 100 mM de NaCl, et Rogers *et al.* (2009) n'ont constaté qu'une réduction de 3% à 140 mM. La réduction dans cette étude de 12% de la germination de l'écotype o9 de *L. ornithopodioides* dans 140 mM de NaCl est également similaire à une réduction de cette espèce de 14% déjà signalée par Boschma *et al.* (2008) à la même concentration saline. Cependant, le taux de germination à 140 mM de *T. tomentosum* (69% pour l'écotype t8) est plus élevé que celui trouvé par Rogers *et al.* (1997b) qui a été de l'ordre de 45% sans signaler l'origine des semences qu'ils ont utilisé (banque de graines). L'écotype t8 a été prélevé d'un site côtier et qui peut recevoir une certaine salinité d'origine marin. Il se peut qu'il existe une relation entre la tolérance à la salinité au moment de la germination et l'écologie de l'espèce. Cette remarque se manifeste bien pour l'écotype o9 le seul qui a été prélevé du site 9 (Marina) et qui a manifesté une bonne germination sur 220 mM NaCl. Dans ce sens la connaissance de la tolérance de la salinité au moment de la germination peut être une information utile mais non suffisante pour expliquer la distribution des espèces et leur développement dans les milieux salés.

3.2 La récupération de germination après l'exposition à la salinité

Les expériences de transfert de graines sur milieu témoin (0 mM NaCl) après prétraitement avec du NaCl sont conduites pour préciser le mode d'action du sel sur la germination. Les résultats montrent que les effets sont d'abord de nature osmotique, du fait de la reprise de la germination une fois que la contrainte saline a été levée. Le rétablissement de la germination au moment du transfert à l'eau douce après l'exposition à une période de forte salinité a été signalé plus pour les graines de plantes halophytes que pour les légumineuses annuelles (glycophytes) (Khan et Ungar, 2001 ; Hanslin et Eggen, 2005 ; Flowers et Colmer, 2008) d'où l'intérêt de ces résultats. Néanmoins, des phénomènes de toxicité dus à l'accumulation des ions Na^+ et Cl^- , se sont également manifestés, comme en témoigne la baisse de la capacité germinative, par rapport à leurs témoins (0 mM NaCl), même après le retour à un milieu ne contenant pas de NaCl. D'ailleurs, on a noté une absence de reprise de germination chez les écotypes a7, c4, g2, g14, i8, st7, st8, t3, t8 et t10. Il se peut que le sel ait altéré les voies métaboliques de remobilisation des réserves qui sont nécessaires au cours de la germination. La capacité de récupérer le pouvoir germinatif a des implications pour l'établissement des semis dans des environnements salins, en particulier lorsque la pluie initiale est insuffisante pour rincer les sels de la surface du sol. Dans de telles situations, les graines imbibées sont en mesure de survivre jusqu'à des pluies ultérieures qui permettront l'achèvement de la germination. Toutefois, ce mécanisme ne peut jouer un rôle que dans les situations où la surface du sol reste humide, sinon les graines imbibées mourront de stress hydrique. Les observations de la germination retardée de *Melilotus siculus* (Nichols *et al.*, 2010b) dans des parcelles de zones très salées, par rapport aux moins salées, ont indiqué que ce mécanisme est d'une grande importance chez cette légumineuse annuelle. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la signification adaptative de ce caractère.

3.3 Ions et effets osmotiques et/ou toxiques

Les effets toxiques des ions de NaCl, plutôt que des effets osmotiques, semblent être la principale cause de réduction de la germination des écotypes et plus particulièrement chez a7, b6, c4, c17, g2, g14, i8, st7, st8, t3, t8 et t10. Ceci a été prouvé par leur taux de germination plus élevé dans la solution iso-osmotique 380 mM de mannitol.

L'augmentation marquée de Na^+ dans les graines imbibées avec l'augmentation de la salinité indique qu'aucune de ces espèces n'est en mesure d'empêcher la pénétration de Na^+ dans les graines. Le déclin marqué de K^+ avec des concentrations croissantes de NaCl pour la majorité des écotypes de *T. bocconeii*, *T. arvense*, *T. stellatum*, *T. campestre*, *T. tomentosum* et la variété Paradana peut aussi indiquer des dommages des membranes cellulaires et les fuites de solutés (Munns, 2002). Par contre, les écotypes i1, i2 et i3 de *T. isthmocarpum* et o9 de *L. ornithopodioides* ont une capacité à réduire une telle fuite, qui peut aussi contribuer à leur supérieure tolérance à la salinité par rapport aux autres écotypes et autres espèces. Un constat qui ne s'applique pas sur les écotypes ch5, ch19 et ch20 de l'espèce *T. cherleri* qui bien qu'ils ont enregistré les taux de germination sur 220 mM les plus élevés, ils ont accumulé d'importantes concentrations en Na^+ . Il se peut que leurs graines contrôlent leur homéostasie par la compartimentation de Na^+ dans la vacuole pour l'ajustement osmotique. Ce résultat peut expliquer en partie la faible reprise de germination de ces écotypes sur milieu non salin après traitements avec des concentrations salines, comme il peut avoir un effet ultérieur sur leur développement végétatif.

3.4 Adaptation des espèces étudiées aux sols salins

Les résultats permettent d'évaluer l'adaptation des douze légumineuses fourragères annuelles étudiées par rapport aux sols salins. Un constat à prendre avec réserve puisque pour certaines espèces un nombre restreint d'écotypes a été utilisé. Les écotypes ch5, ch19 et ch20 de *T. cherleri*, o9 et o16 de *L. ornithopodioides* et les écotypes i1, i2, i3, i6, i10 et i12 de *T. isthmocarpum* ont les mécanismes les plus adaptés pour la survie aux premières phases du cycle végétatif (germination) sur des sols salins par rapport à la variété témoin Paradana. Ils n'ont subi aucune perte de pouvoir germinatif à des niveaux de salinité allant jusqu'à 140 mM de NaCl et ils ont la capacité à récupérer un certain pourcentage de germination après exposition à 220 mM de NaCl. En deuxième lieu arrivent les écotypes sc1 et sc3 de *T. scabrum* qui ont tendance à éviter la salinité dans la phase de germination. Vu qu'ils ont enregistré une reprise presque totale de la germination sur milieu salin après prétraitement avec 140 mM de NaCl similaire à la variété Paradana et une reprise plus élevée sur 220 mM par rapport à Paradana. La plus grande tolérance des écotypes i1, i2, i3 et o9 à la salinité est également renforcée par leur capacité à maintenir des concentrations en K^+ dans les tissus des graines, supérieures à celles des autres écotypes. Toutefois, *T. isthmocarpum* peut être l'espèce la plus intéressante puisqu'elle a été signalée tolérante à l'engorgement au stade

végétatif (Rogers *et al.*, 2009). Ce qui laisse penser que *T. isthmocarpum* aura un potentiel considérable en tant que nouvelle espèce de légumineuses de pâturage pour les sites salins à tendance d'être inonder, il reste à prouver qu'elle peut tarder le ramollissement de ses graines et qu'elle va assurer la même tolérance au développement végétatif.

3.5 Modèles de la germination des légumineuses annuelles pastorales à graines dures dans des environnements salins

Les écotypes ch5, ch19, ch20, i1, i2, i3, i6, i10, i12, o9, o16, sc1 et sc3 ont présenté les résultats les plus intéressants quant au taux de germination en présence du sel, à la reprise de germination sur milieu non salin après traitement sur milieu salin et leurs teneurs en ions. On a remarqué que la teneur en ions Na^+ a été plus élevée dans les graines imbibées que celles dures et le contraire pour les ions K^+ . Ainsi l'utilisation des traitements salins allant de 70 mM au 220 mM de NaCl et l'étude des paramètres cités au dessus permettent d'imaginer un modèle de germination des graines de ces écotypes dans la nature et sur des zones pastorales salines. Reste à suivre leur développement ultérieur. Il a été démontré par Karaki (2001) que les téguments imperméables des graines les protègent de niveaux élevés de salinité de surface au cours des mois d'été-automne. Certaines de ces graines dures s'adoucissent pendant cette période et sont prêtes à germer avec les premières pluies d'automne. Les graines dures restantes aident à maintenir une banque de semences dans le sol et seront disponibles pour l'adoucissement et la germination dans les saisons ultérieures.

On déduit ainsi que si les niveaux de salinité sont faibles, les graines perméables germent. Si les niveaux de salinité sont trop élevés pour réussir la germination, deux voies peuvent avoir lieu. Pour les espèces ayant retardé l'adoucissement des graines, la germination est reportée au plus tard dans la période automne-hiver, lorsque les niveaux de la salinité de surface des sols sont susceptibles d'être faibles. Dans le cas contraire, la germination des graines perméables, peut être inhibée par des effets toxiques des ions spécifiques, par des effets osmotiques, ou par les deux à la fois. Si un niveau de salinité critique est dépassé, la mort des graines peut survenir.

4. Conclusion

A partir de l'étude de l'effet de la salinité sur la germination des 40 écotypes testés de 12 espèces ; 14 écotypes seulement ont été sélectionnés pour étudier l'effet du sel sur la

croissance végétative afin de prouver si leur comportement vis-à-vis de la salinité pendant la phase germinative sera respecté durant leur croissance. Les écotypes sélectionnés sont les suivants : ch5, ch19, ch20, i1, i2, i3, i6, i10, i12, r8, sc1, sc3, o9 et o16.

B. Effet de la salinité sur la croissance végétative de 14 écotypes de trèfles et lotier

1. Matériels et méthodes

1.1 Conduite de l'essai

L'expérimentation a été conduite sur 14 écotypes de trèfle et lotier, retenus sur la base de leur tolérance à la salinité en fonction du test de germination. Les écotypes choisis sont présentés dans le tableau 15. La variété Paradana de l'espèce annuelle *T. michelianum* a été choisie comme espèce témoin.

Tableau 15. Liste et origine des écotypes utilisés (les caractéristiques de chaque site sont illustrées dans le Tableau 6-Chapitre 2)

Espèce	Ecotype	Sites	% Germination sur 220 mM NaCl
<i>T. cherleri</i>	ch5	S5	57
	ch19	S19	53
	ch20	S20	54
<i>T. isthmocarpum</i>	i1	S1	27
	i2	S2	50
	i3	S3	41,3
	i6	S6	22
	i10	S10	37
	i12	S12	25,3
<i>T. resupinatum</i>	r8	S8	20
<i>T. scabrum</i>	sc1	S1	46
	sc3	S3	49,6
<i>L. ornithopodioides</i>	o9	S9	48
	o16	S16	32

1.2 Installation de l'essai

L'essai a été conduit sous serre avec un sol prélevé de la station expérimentale de Guich à l'INRA de Rabat (34°03' N, 06°46' O). Il a duré de novembre 2008 au mars 2009, en conditions naturelles d'éclairement, températures maximales de 30 à 42°C et minimales de 15 à 28°C, humidité relative maximale de 80% à 95% et minimale de 25% à 45%. L'essai a été réalisé en pots de 20 cm de hauteur, de 1 litre de volume et de 16 cm de diamètre inférieur. Ils ont contenu chacun au fond une couche de gravier facilitant le drainage et la percolation des

excès d'eau. Chaque pot a été rempli d'un mélange de tourbe (1/3) et du sol (2/3) provenant de sol du domaine Guich. Le sol appartient à la classe des vertisols. La texture est en général argileux-limoneuse à pH 7,3 ; pauvre en matière organique (1,5%), avec une teneur modérée en phosphore (65 kg ha⁻¹), et en potassium (159 kg ha⁻¹). Les graines pré-germées de chaque traitement (Partie A. paragraphe 2.2 Protocole de germination) ont été repiquées dans les pots à raison de 8 par pot. Des irrigations fertilisantes régulières ont été effectuées afin d'avoir un bon départ végétatif. La solution nutritive de base est la solution de Hoagland (Karmoker et Van Steveninck, 1978) (Annexe 3). Un éclaircissage a été réalisé au stade quatre feuilles pour n'en garder que 4 plantules à la fin, évitant ainsi la compétition inter-plantes. L'application des traitements salins a commencé au stade 4 feuilles avec l'eau additionnée de NaCl : 0mM (témoin), 140 mM et 220 mM. Pour éviter les chocs osmotiques, l'addition de NaCl a été fractionnée dans les pots de culture jusqu'à l'obtention de la concentration de sel correspondant au traitement désiré à raison de 20 mM/jour. Un lessivage périodique a été effectué pour éviter tout dépôt de sel, en lavant chaque pot à l'eau distillée, 20 jours après l'application de l'irrigation saline.

Le dispositif expérimental a comporté 45 traitements (15 écotypes x 3 niveaux de salinité) avec trois répétitions randomisées soit 135 pots. Le choix des niveaux de salinité a été justifié par les concentrations très variables des eaux d'irrigation dans les périmètres irriguées au Maroc (Lahlou *et al.*, 2002). L'application du stress salin a été réalisée à partir de la 6^{ème} semaine qui a suivi l'installation. L'essai a duré 18 semaines depuis l'installation.

1.3 Mesures effectuées

1.3.1 Surface foliaire des plantes

À la fin de la période expérimentale, deux plantes par pot ont été choisies au hasard pour mesurer la surface foliaire (cm²) par plante. Elle a été déterminée en utilisant un senseur hémisphérique l'analyseur de couvert L.A.I (Leaf Area Index) (LI-2000 LICOR Biosciences, Lincoln, NE).

1.3.2 Indice de succulence

La succulence désigne la propriété qu'ont certaines plantes d'hypertrophier certaines de leurs parties aériennes (tiges et feuilles) afin d'y stocker de l'eau quand celle-ci est difficile

d'accès dans les habitats où vivent ces plantes. Particulièrement quand les sols développent une contre pression osmotique suffisamment importante pour s'opposer à l'absorption racinaire de l'eau comme c'est le cas des sols salés. L'indice de succulence est déterminé par le rapport du contenu en eau de la partie aérienne et de la surface foliaire totale selon la formule proposée par Ober *et al.* (2005).

$$IS (g.cm^{-2}) = (MF - MS) / SF$$

MF : masse de matière fraîche (g)

MS : masse de matière sèche (g)

SF : surface foliaire totale (cm²)

2.3.3 Taux de croissance relative

Pour apprécier l'effet du sel sur l'activité biosynthétique, le taux de la croissance moyenne relative (CMR) des parties aériennes a été calculé sur les différents milieux de culture. Il a été calculé d'après Diego *et al.* (2005) selon la formule suivante : $CMR = \frac{[Ln(H t2) - Ln(H t1)]}{t2 - t1}$

H_{t1} = Hauteur de la plante (cm) au temps t1

H_{t2} = Hauteur de la plante (cm) au temps t2

1.3.4 La production de biomasse

A la récolte, les racines ont été rincées délicatement à l'eau distillée pour les éliminer de leur substrat. Ensuite, les plantes ont été séparées en parties aériennes et racinaires et pesées immédiatement pour la détermination du poids frais. La matière sèche a été déterminée en pesant les échantillons après séchage à 60°C pendant 48 heures.

1.3.5 Caractéristiques hydriques de la plante

- **Teneur relative en eau**

La teneur relative des feuilles en eau (TRE) a été déterminée par la méthode décrite par Inoue *et al.* (1993) après 4, 8 et 12 semaines de l'application du traitement salin. Les feuilles de deux plantes par pot ont été coupées à la base du limbe et pesées immédiatement pour obtenir leur poids frais (PF). Ces feuilles ont été trempées par la suite dans de l'eau distillée pendant 24 heures à une température de 5°C. Elles ont été essuyées pour éliminer l'excès d'eau à leur surface puis pesées de nouveau pour obtenir le poids de la pleine turgescence

(PPT). Les feuilles ont été enfin mises à l'étuve à 80°C pendant 24 heures et pesées pour avoir leur poids sec (PS). La turgescence des feuilles a été déduite par la formule suivante :

$$TRE = (PF - PS / PPT - PS) \times 100.$$

- **Potentiel osmotique**

Des jeunes feuilles de chaque échantillon et de chaque traitement ont été coupées au début de l'expérience puis après 4, 8 et 12 semaines de l'application du traitement salin et mises immédiatement dans l'azote liquide et conservées à -70°C. Le potentiel osmotique a été mesuré par des psychromètres (L-51, Wescor, USA). Les feuilles ont été décongelées en les plaçant à 20°C. Le papier filtre imbibé de sève protoplasmique provenant des cellules éclatées des feuilles a été mis dans la chambre psychrométrique. La lecture en microvoltmètre (transformé en Méga pascal (MPa), a été effectué dans le microvoltmètre HR-33T dew point (Wescor, USA) après une période de 15 à 20 mn, période nécessaire à la stabilisation de la température dans la chambre du psychromètre.

1.3.6 Conductance stomatique

Le stress salin induit un stress hydrique. La variation de la conductance stomatique est dictée par l'ouverture et la fermeture des stomates. Généralement, lorsqu'une plante est induite en stress hydrique, elle enregistre une conductance stomatique inférieure à celle des plantes témoins, montrant ainsi une réduction de la transpiration due au manque d'eau. Ainsi, la conductance stomatique est un indicateur du taux de transpiration foliaire, et un paramètre de l'état hydrique de la plante. Elle a été mesurée à l'aide de l'analyse par infrarouge par le LICOR (LI-6400, LICOR Inc, Lincoln, NE, USA). Un appareil portatif utilisant une technique de mesure en circuit fermé du taux de décroissance du CO₂ par spectrométrie différentielle (IGRA avec un circuit de référence sans CO₂). La conductance stomatique est exprimée en mmol H₂O m⁻²s⁻¹. Trois mesures ont été effectuées par feuille. Chaque mesure correspond à la moyenne des valeurs de l'intensité de transpiration pendant 40 secondes. Les mesures ont été effectuées sur la feuille qui est bien développée. La conductance stomatique a été déterminée dans la même journée et sur les mêmes plantes que le potentiel osmotique foliaire.

1.3.7 Effet du sel sur l'absorption ionique

Le suivi de la teneur en ions Na^+ et Cl^- ainsi que du K^+ au sein des écotypes testés, permet de comprendre l'aptitude particulière à utiliser ces ions pour l'ajustement osmotique. Les ions Na^+ , K^+ et Cl^- ont été analysés à la fin de la période expérimentale dans les parties aériennes et racinaires des plantes. La concentration de Cl^- a été mesurée par coulométrie (chloridomètre Buchler Cotlove), sur le produit d'une extraction à froid dans HNO_3 0,1 N (Begum *et al.*, 1992). Les concentrations des ions K^+ et Na^+ ont été dosées par photométrie de flamme en émission (Jenway Ltd, modèle PFP7; Essex, Royaume-Uni) selon Glenn *et al.* (1994). Ensuite le rapport K^+/Na^+ a été calculé. L'objectif du calcul de ce rapport est la désignation de la croissance de la plante. Il a été suggéré que le seuil 1 du rapport K^+/Na^+ des plantes soumises à la salinité traduit une croissance normale. Lorsque ce ratio égale 1 ou plus, ceci signifie que la plante peut sélectionner plus de potassium que du sodium afin d'éviter la toxicité de sodium (Wyn Jones *et al.*, 1989).

1.3.8 Teneur en sucres solubles

Le dosage des sucres solubles totaux a été déterminé par la méthode de Schields et Burnett améliorée par Buysse et Merckx (1993). A 100 mg de matière fraîche aérienne, on a ajouté 3 ml d'éthanol à 80%. L'ensemble a été mis dans un bain Marie à 80 °C pendant 30 mn pour faire évaporer l'alcool. Après refroidissement, 1 ml de l'extrait a été prélevé auquel on a ajouté 1 ml de solution de phénol à 5%. Après agitation soigneuse, on a ajouté 5 ml d'acide sulfurique puis on a procédé à une agitation rapide (agitateur vortex). L'ensemble a été maintenu pendant 45 mn à 5°C puis incubé pendant 30 mn à l'obscurité. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à une longueur d'ondes de 485 nm. Les résultats des densités optiques ont été rapportés sur une courbe étalon des sucres solubles (exprimée en glucose).

1.3.9 Teneur en Proline

La méthode utilisée est celle de Rascio (1992). A 100 mg de matière fraîche aérienne on a ajouté 2 ml de méthanol à 40%. L'ensemble a été porté à 85°C dans un bain marie pendant une heure. Après refroidissement, on a prélevé 1ml de l'extrait auquel on a ajouté 1ml d'acide acétique, 25 mg de ninhydrine et 1ml de mélange (120 ml d'eau distillée + 300 ml d'acide acétique + 80 ml d'acide orthophosphorique de densité 1,7). La solution obtenue a été portée à ébullition pendant 30mn. Une fois la couleur a viré au rouge, on a refroidit et on a ajouté 5

ml de toluène. Deux phases se séparent : la phase supérieure contient la proline et la phase inférieure sans proline. Après avoir récupéré la phase supérieure (colorée en rouge), on a ajouté du NaSO₄ afin d'éliminer l'eau qu'elle contient. La densité optique a été lue à une longueur d'ondes de 528 nm. Les valeurs des densités optiques obtenues ont été rapportées sur une courbe étalon établie à partir d'une série de solutions de concentrations connues en proline.

1.3.10 Analyses statistiques

Le programme Systèmes d'Analyses Statistiques (SAS, Inc., Cary, North Carolina, USA) a été utilisé pour réaliser les analyses de la variance, la comparaison des moyennes et les corrélations.

2. Résultats

2.1 Surface foliaire

On rappelle que les écotypes testés appartiennent à des espèces différentes, ce qui fait que naturellement la surface foliaire (SF) diffère d'une espèce à l'autre (même si dans un milieu non salin). Ainsi on va parler de la réduction de la surface foliaire sous concentration saline pour chaque écototype par rapport à son témoin sur milieu non salin (0 mM).

L'analyse de la variance de la SF montre un effet très significatif ($p < 0,001$) de l'interaction écototype et salinité. La figure 11 représente l'effet du NaCl sur la SF des écotypes étudiés. Sur milieu non salin, les SF sont plus importantes et variables entre les écotypes. La SF la plus élevée ($\approx 9 \text{ cm}^2$) a été observée chez les écotypes i2 et i3 de *T. isthmocarpum*. L'effet dépressif de sel s'est manifesté dès la dose moyenne de NaCl (140 mM). A ce niveau de traitement, la diminution de la SF des écotypes (de toutes les espèces) par rapport à leurs témoins (0 mM), a été comprise entre 3,85% et 32,7%. A la concentration 220 mM de NaCl, la diminution par rapport à leurs témoins (0 mM) a devenu encore plus accentuée et elle a varié entre 22% et 82%.

Bien que l'écotype i3 ait présenté une grande SF par rapport aux autres écotypes dans le milieu non salin, il a été le plus affecté par la contrainte saline sévère. Un stress moyen ne lui a diminué la SF que de 11% alors qu'une concentration de 220 mM a provoqué une diminution de l'ordre de 70%. Les écotypes ch19 et ch20 ont manifesté les plus grandes

réductions aussi bien sur 140 mM que 220 mM en moyenne 30% et 70% respectivement. Malgré que les écotypes sc1 et sc3 ont eu la SF la plus petite (par nature de l'espèce), ils ont enregistré la moindre réduction de celle-ci pour les deux traitements salins avec respectivement 4,3% et 16,9% en moyenne. La variété Paradana n'a pas été significativement ($p>0,05$) touchée par le traitement 140 mM par contre elle l'a été sur 220 mM de l'ordre de 75% ($p<0,01$). Chez les écotypes o16 et i10 en plus de la diminution de la SF, on a observé au traitement le plus stressant une diminution du nombre total des feuilles et une chute prématurée par sénescence. Ainsi, L'effet de la salinité s'est traduit par une réduction de la croissance et de la taille de la surface verte.

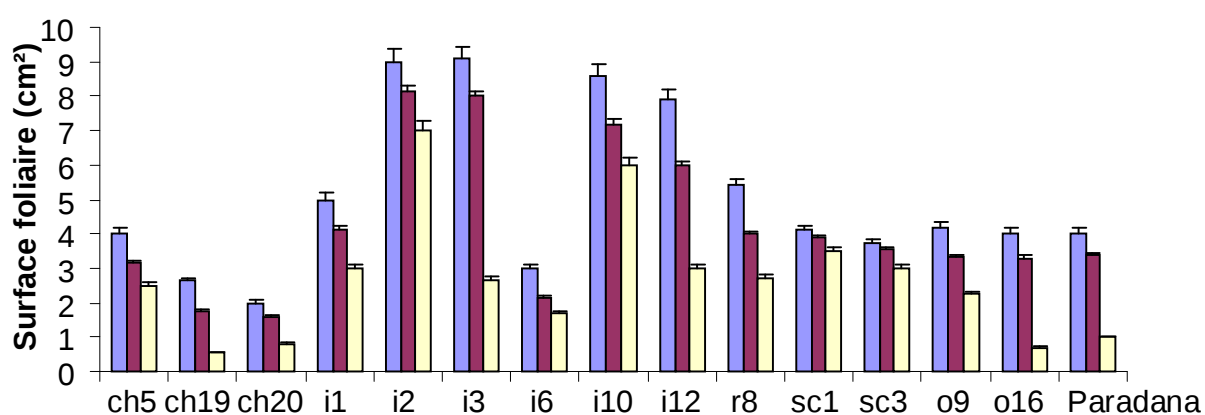


Figure 11. Variation de la surface foliaire des écotypes de trèfle et de lotier soumis à différentes concentrations de NaCl : 0 mM (■); 140 mM (■) et 220 mM (■). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

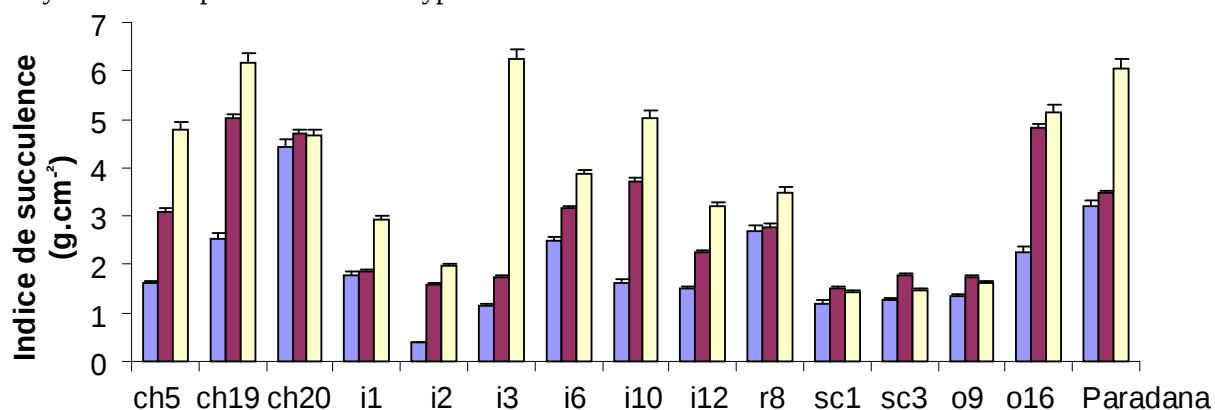


Figure 12. Variation de l'indice de succulence foliaire des écotypes de trèfle et lotier soumis à différentes concentrations de NaCl : 0 mM (■); 140 mM (■) et 220 mM (■). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

2.2 Indice de succulence

L'analyse de la variance de l'indice de succulence (IS) montre un effet significatif ($p<0,01$) de l'interaction écototype et salinité. Par opposition à la SF, qui a diminué à 140 mM

de NaCl, l'IS foliaire des écotypes étudiés a augmenté au niveau de ce traitement (Figure 12) traduisant une nette amélioration de l'hydratation des parties aériennes. Avec l'augmentation du stress salin, le comportement génotypique devient différent. En effet, pour la majorité des écotypes, l'IS a continué d'augmenter jusqu'à la concentration 220 mM de NaCl. Pour d'autres comme sc1, sc3 et o9 l'IS a diminué à partir de 140 mM de NaCl mais les valeurs obtenues en 220 mM sont toujours supérieures à celles observées chez les témoins. De plus, les écotypes qui ont connu une grande réduction de la SF ont enregistré l'IS le plus élevé.

2.3 Dynamique de croissance

La figure 13 montre que le taux de croissance moyenne relative (CMR) est très sensible à la salinité du milieu de culture. L'analyse de variance montre que l'interaction écotype-traitement est significative ($p < 0,01$). En comparant les trois concentrations salines on constate que généralement le CMR enregistré en T1 (après deux semaines de l'application du stress) est le plus élevé et il diminue à partir de T2 (après 4 semaines de l'application du stress).

L'écotype o9 n'a pas réduit son CMR à T1 et ceci pour les deux traitements salins par rapport au milieu 0 mM de NaCl. A T2, il semble que le traitement 220 mM lui engendre un taux de croissance plus important que le traitement 140 mM. Ensuite il garde un taux de croissance constant. Les écotypes i2, i3 et i6 soumis au stress 220 mM de NaCl ont présenté une augmentation de CMR durant T1, puis ils ont gardé un CMR identique au traitement 140 mM de NaCl. Les écotypes sc1 et sc3 ont eu le CMR le moins touché par le stress salin aussi bien pour 140 mM et 220 mM de NaCl tout en gardant un CMR constant dès T2. La variété Paradana n'a pas été sévèrement touchée par le traitement 140 mM par contre sur 220 mM elle a réduit significativement ($p < 0,05$) son CMR avec une moyenne de 57% par rapport au 0 mM NaCl. Tandis que le CMR des autres écotypes a diminué dès T1 d'une façon significative ($p < 0,05$), dans les deux milieux salins par rapport au milieu non salin (0 mM).

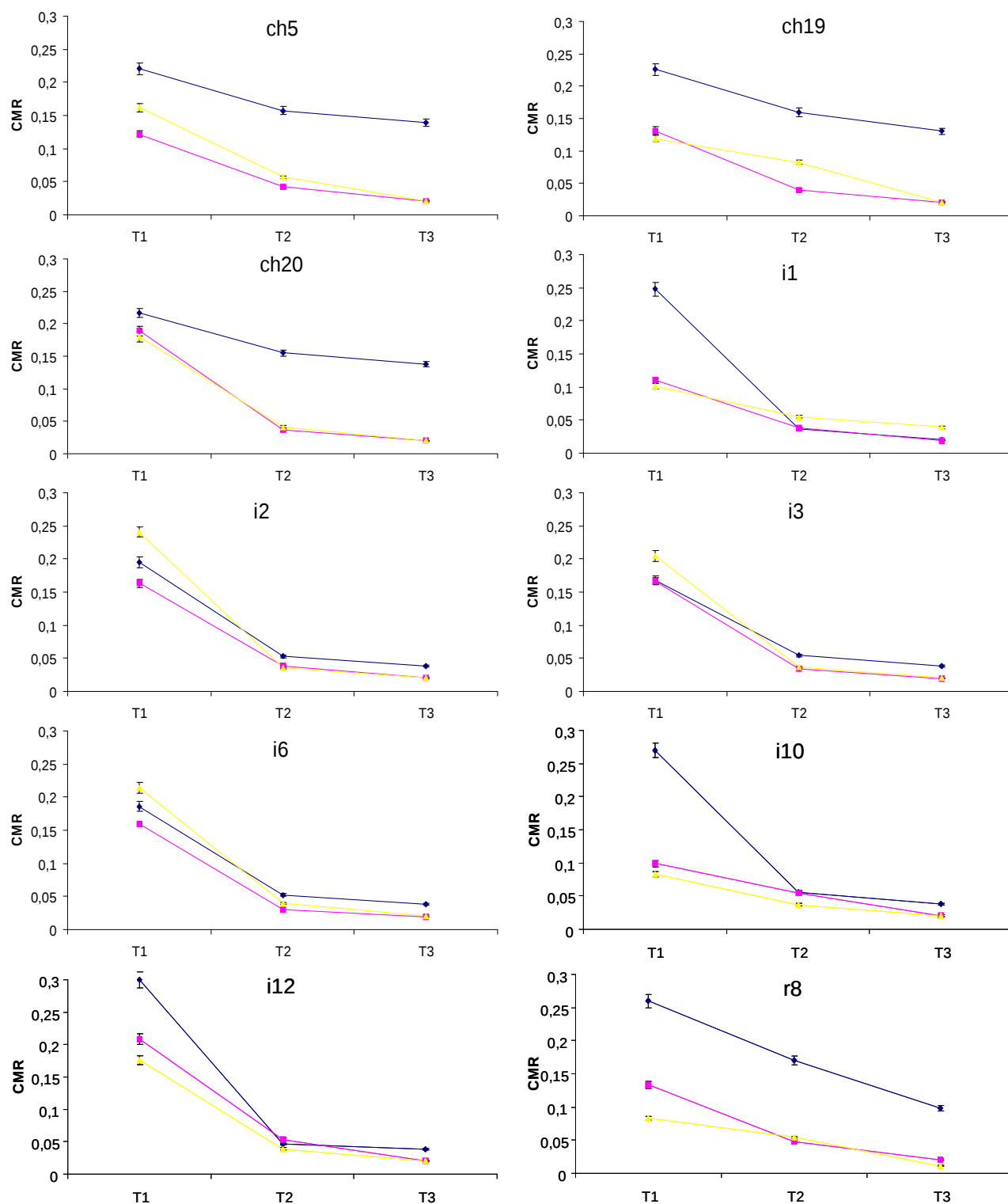


Figure 13. Evolution du taux de croissance moyenne relative (CMR) des écotypes étudiés en fonction de la durée du stress salin, T1 (2 semaines après l'application du stress), T2 (2 semaines après la mesure en T1) et T3 (4 semaines après la mesure en T2). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

—◆— 0mM —■— 140mM —▲— 220mM

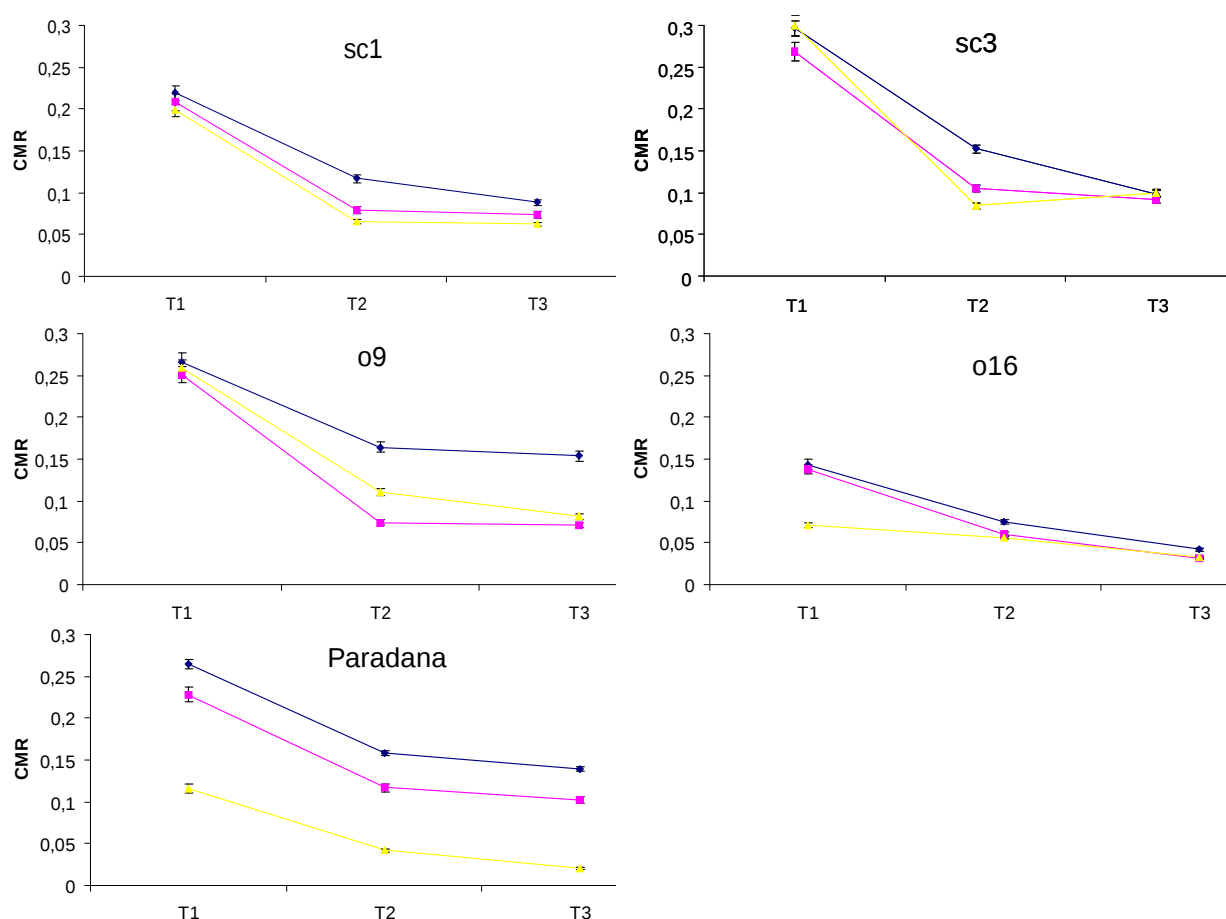


Figure 13 (suite). Evolution du taux de croissance moyenne relative (CMR) des écotypes étudiés en fonction de la durée du stress salin, T1 (2 semaines après l'application du stress), T2 (2 semaines après la mesure en T1) et T3 (4 semaines après la mesure en T2). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

2.4 Matière sèche aérienne

L'action inhibitrice de NaCl sur la croissance des parties aériennes s'est manifestée par une réduction de la matière sèche aérienne (MSA) (Tableau 16). L'analyse de variance a indiqué un effet interactif significatif entre les écotypes et les traitements utilisés ($p < 0,001$). Sous irrigation 0 mM et 140 mM NaCl, l'espèce *T. isthmocarpum* (i1 et i2) et la variété Paradana ont produit les quantités les plus élevées en MSA, ayant respectivement 27,93 g et 28,79 g (0 mM) et 22,34 g (i2) et 23,83 g (140 mM). Cependant sous stress sévère (220 mM NaCl) Paradana n'a pas pu maintenir le même comportement avec un taux de réduction de 64% par rapport à son témoin. On remarque également sous ce stress que le taux de réduction le plus important a été enregistré chez les écotypes ch5, ch19, ch20 et r8 en moyenne de 68%.

Tableau 16. Variation de la matière sèche (g) des parties aériennes (MSA) et racinaires (MSR) en fonction des traitements 0 mM (C1), 140 mM (C2) et 220 mM (C3) prises à la fin de l'essai. Les valeurs d'une même colonne suivie de la même lettre ne diffèrent pas au seuil de 5% selon le test de L.S.D.

Espèces	Ecotypes	MSA			MSR		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>T. cherleri</i>	ch5	16,42 b	7,88 c	6,12 c	4,02 c	3,18 c	3,00 c
	ch19	18,78 b	7,14 c	5,36 c	5,57 c	3,65 c	3,73 c
	ch20	16,98 b	9,23 c	6,31 c	4,86 c	3,42 c	2,77 c
<i>T. isthmocarpum</i>	i1	28,86 a	20,69 a	13,56 b	7,32 b	7,21 b	7,21 b
	i2	22,45 b	22,34 a	18,54 a	10,24 a	10,08 a	8,10 a
	i3	19,38 b	17,27 b	14,66 b	9,07 a	9,00 a	8,97 a
	i6	19,10 b	16,99 b	10,21 b	7,53 b	6,25 b	6,00 b
	i10	19,86 b	17,69 b	12,38 b	7,12 b	7,02 b	6,02 b
	i12	27,00 a	19,68 b	9,38 c	8,02 a	6,17 b	7,00 b
<i>T. michelianum</i>	Paradana	28,79 a	20,83 a	9,14 c	5,93 c	5,09 c	3,21 c
<i>T. resupinatum</i>	r8	21,00 b	10,69 c	9,00 c	7,00 b	3,00 c	3,77 c
<i>T. scabrum</i>	sc1	6,02 c	4,25 c	3,83 c	3,72 c	3,66 c	2,00 c
	sc3	5,85 c	4,02 c	4,07 c	4,62 c	3,28 c	3,00 c
<i>L. ornithopodioides</i>	o9	21,93 b	19,20 b	13,69 b	9,54 a	4,10 c	3,10 c
	o16	21,75 b	16,02 b	13,78 b	7,87 b	3,00 c	3,00 c
LSD _{0,05}		8,09	5,67	1,83	1,20	1,7	0,78

En comparant les écotypes au sein de chaque espèce on constate que :

Pour *T. isthmocarpum* et sous le régime sans sel, tous les écotypes ont produit des quantités en MSA proches statistiquement. Alors qu'en conditions stressantes, ils ont réagi différemment. L'écotype i2 est nettement plus tolérant et ceci pour les deux niveaux de stress avec une réduction de 9% et 28,3% respectivement sur 140 mM et 220 mM de NaCl par rapport au milieu 0 mM. Les taux de réduction liés au stress 140 mM ont été aux alentours de 11% pour i3, i6 et i10 de 23,2 % pour i12. Alors que sur milieu salin sévère, i12 a été le plus sensible avec 61% de réduction de production en MSA par rapport à sa production sous 0 mM.

Pour *T. cherleri* tous les écotypes ont montré dès 140 mM de NaCl une réduction de MSA supérieure à 50%.

Pour *L. ornithopodioides*, en absence du sel et sur milieu moyennement stressant o9 a produit une quantité élevée en MSA par rapport à o16. En conditions du stress sévère ils ont eu une production en MSA non différente statistiquement.

Pour *T. scabrum*, on constate que c'est l'espèce qui a produit la moindre MSA sous conditions non salines. Pourtant sa réduction sur milieu salin sévère 220 mM est la plus faible en moyenne 30%. Les moyennes de la production en biomasse sous irrigation salée moyenne et sévère ont été statistiquement équivalentes selon test LSD.

2.5 Matière sèche racinaire

L'analyse de la variance a révélé un effet significatif ($p < 0,01$) de l'interaction entre les écotypes et les traitements utilisés pour la production en matière sèche racinaire (MSR). Toutefois, la production en MSR a été moins affectée par la salinité que la MSA (Tableau 16). Les taux de réduction n'ont pas touché 50%, sauf pour *L. ornithopodioides*, chez qui on a noté une forte réduction de MSR sous les deux irrigations salines de 64% en moyenne par rapport à son témoin (0 mM NaCl). Un autre résultat intéressant à noter est que sur milieu sévèrement salin les écotypes i1, i2, i3, i6 et i10 de *T. isthmocarpum* ont développé des MSR statistiquement identiques à celles enregistrées sur 0 mM NaCl. Les écotypes ch19, ch20 et r8 ont vu leur MSR réduite de 42% en moyenne sur 220 mM NaCl par rapport à leurs témoins (0 mM NaCl).

2.6 Teneur relative en eau des feuilles

L'effet du temps sur la teneur relative en eau des feuilles (TRE) est non significatif pour le traitement non salin (0 mM) et significatif ($p < 0,01$) pour les traitements salins (140 mM et 220 mM de NaCl). L'analyse de la variance révèle également un effet interactif significatif écototype-salinité ($p < 0,01$).

En comparant tous les écotypes on constate que les espèces *T. cherleri*, la variété Paradana et les écotypes i3 et i10 de *T. isthmocarpum* ont maintenu leur TRE constante tout au long de l'essai sous les deux types d'irrigation.

Au sein des écotypes de *T. isthmocarpum*, le classement des moyennes selon le test LSD a révélé la supériorité des écotypes i1, i3 et i6 aussi bien sur milieu témoin que les milieux salins (Figure 14). Cependant, la TRE des feuilles a diminué au fur et à mesure que la salinité s'est accentuée. Ainsi au début de l'essai, la moyenne de la TRE des écotypes testés a été de l'ordre de 80 % sur milieu témoin (0 mM), 72% sur 140 mM et 62 % sur 220 mM de NaCl. Au milieu de l'expérience (T2), la TRE des feuilles des plantes modérément stressées :

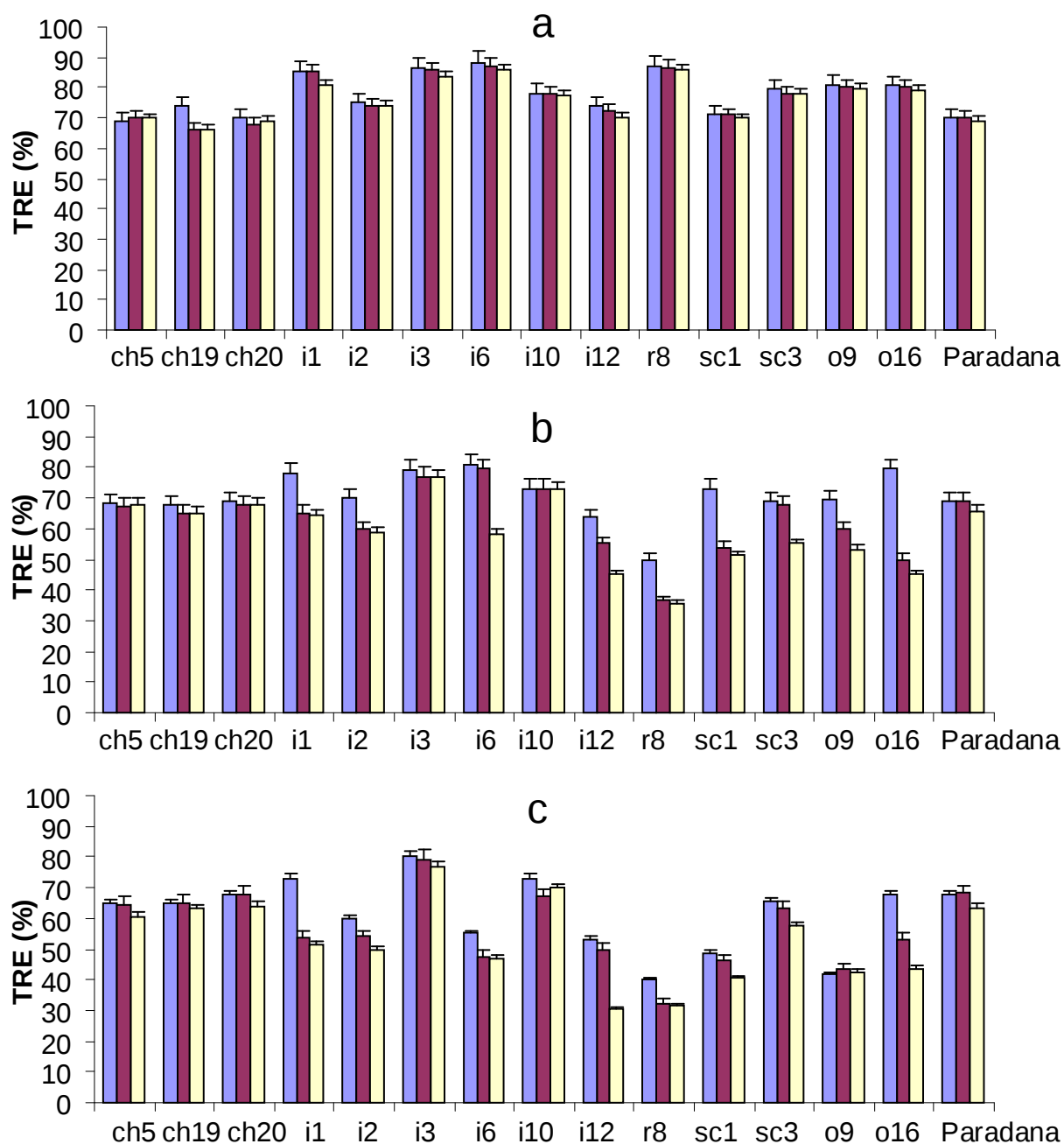


Figure 14. Teneur relative en eau des feuilles (TRE %) de quinze écotypes de trèfle et de lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (140 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

(140 mM) a chuté sauf chez l'écotype i6. Tandis que l'écotype i12 a enregistré sur ce même milieu la valeur la plus faible (45%). Toutefois, pour les autres écotypes la TRE n'a pas diminué au dessous de 50% à la fin de la période expérimentale (T3). Le stress salin sévère (220 mM) a entraîné une chute graduelle de la TRE pour atteindre à la fin du traitement salin (T3) sa valeur la plus faible chez i12 (30 %) et la plus élevée chez i1 (51%). En moyenne, la TRE des écotypes a été réduite de 40% par rapport au milieu 0 mM de NaCl.

Pour *T. scabrum*, l'écotype sc3 a manifesté une résistance importante à la salinité par rapport à sc1 sur milieu salin modéré (140 mM) puisque sa TRE est statistiquement identique à celle enregistrée sur milieu non salin. En plus il a montré sous stress salin sévère des valeurs importantes et constantes tout au long de l'essai.

T. resupinatum a enregistré la TRE la plus faible par rapport aux autres espèces à la fin de la période expérimentale sous les régimes salins, avec en moyenne une réduction de 64% par rapport au milieu non salin.

L. ornithopodioides, o9 s'est avéré plus résistant au stress salin puisqu'il a montré une bonne aptitude d'ajustement d'hydratation. Même si cet écotype a enregistré une TRE plus faible en T1 par rapport à l'écotype o16 sous les deux traitements salins, il a été capable de maintenir sa turgescence en eau constante tout au cours de la période expérimentale. A la fin des deux traitements salins, les valeurs moyennes de TRE sont statistiquement proches 49% en 140 mM de NaCl et 43 % en 220 mM de NaCl, avec une réduction de 28 % en moyenne par rapport au traitement non salin.

2.7 Potentiel osmotique

L'évolution du potentiel osmotique (PO) en fonction du temps est significatif ($p < 0,001$). L'analyse de la variance révèle également un effet interactif significatif écotype-salinité ($p < 0,01$).

Sous le traitement non salin (Figure 15a), le PO foliaire reste constant tout au long de la période expérimentale pour la totalité des écotypes. Toutefois les écotypes ch19, ch20 et r8 ont enregistré un PO foliaire faible par rapport aux autres écotypes.

Sous le traitement salin modéré (140 mM NaCl), tous les écotypes ont vu leur PO chuter mais à des degrés différents (Figure 15b). Au début de l'essai (T1), les écotypes i2, i3, i10, sc1 et sc3 ont enregistré les PO foliaires les plus élevés en moyenne de -1,09 MPa. Alors que r8, o9, o16 et Paradana ont manifesté les PO foliaires les plus faibles en moyenne de -2,01 MPa. Au milieu de l'essai (T2) le PO a décru sauf chez les écotypes i2, i3, i10 et sc3. À la fin de l'essai (T3) le PO a décliné chez tous les écotypes. Cependant ce sont les écotypes ch5, ch19 et ch20 qui ont réduit le moins leur PO par rapport à T1 avec seulement 20% de réduction en moyenne.

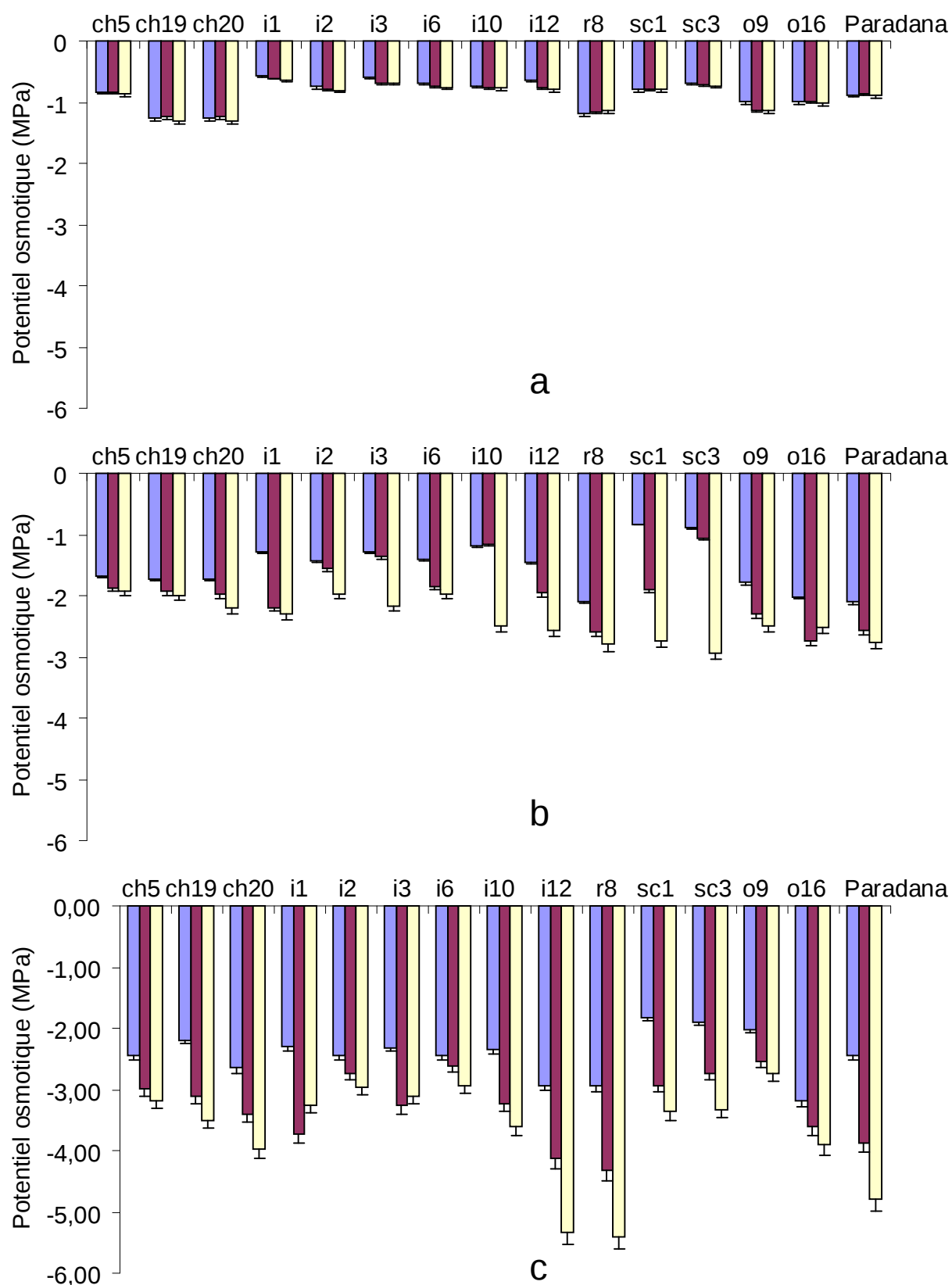


Figure 15. Potentiel osmotique (MPa) des écotypes de trèfle et de lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (140 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

Sous le traitement salin sévère (220 mM), la chute du PO en fonction du temps a été plus rapide et importante qu'en 140 mM (Figure 15c). Toutefois, on constate que l'écotype o9 a enregistré des valeurs statistiquement identiques à ceux du traitement 140 mM de NaCl. Le PO de r8 a diminué d'autant plus avec une réduction de 90% par rapport à son témoin sur milieu non salin en T3. Comme dans l'essai 140 mM, les écotypes i2, i3, i6 et i10 ont enregistré le PO foliaire le plus élevé. La variété Paradana a manifesté une grande chute de son PO à la fin de la période expérimentale de l'ordre de 92% par rapport au traitement non salin.

2.8 Conductance stomatique

2.8.1 Comportement des écotypes en fonction des traitements

La figure 16 présente la variation de la conductance stomatique des feuilles (CS) prise en trois temps différents tout au cours de l'essai. L'analyse de la variance ne montre pas d'effet significatif de l'interaction écotype-salinité, toutefois l'effet de traitement est significatif ($p < 0,01$). Les plantes stressées ont eu une CS inférieure à celle des plantes témoins (sous 0 mM de NaCl) montrant ainsi une réduction de la transpiration. La CS a décru tout au long des traitements salins. Sous stress salin modéré (140 mM), les plantes stressées ont vu leur CS décroissante progressivement depuis le début du traitement salin jusqu'à la fin de l'essai. Sous traitement salin sévère (220 mM de NaCl) et pour la majorité des écotypes les valeurs de CS ont régressé entre T1 et T2 et ont resté statistiquement proches jusqu'à la fin de la période expérimentale (T3) où elles ont gagné presque les mêmes valeurs que celles obtenues sous 140 mM.

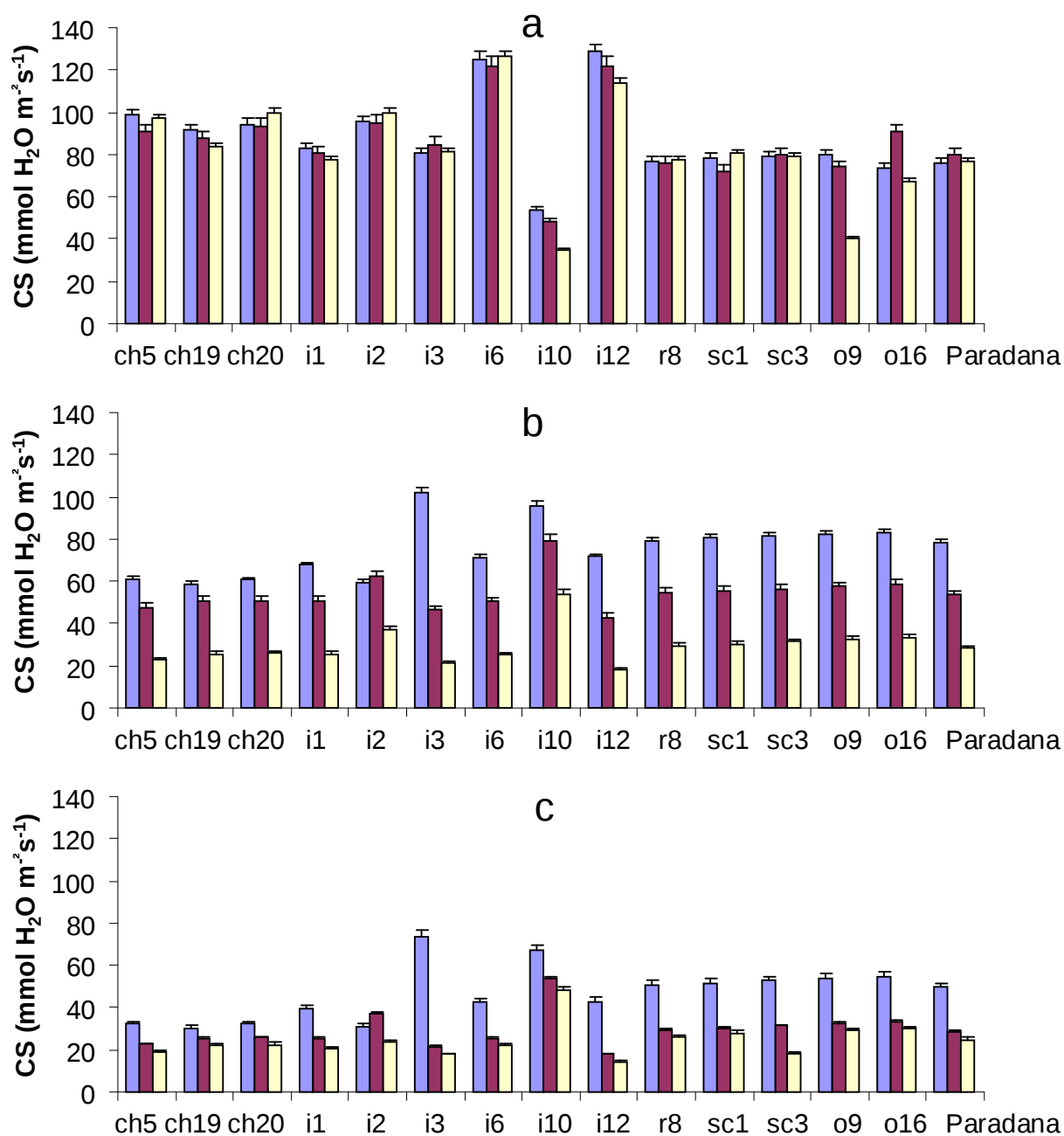


Figure 16. Conductance stomatique CS ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) des écotypes de trèfle et de lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (140 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

2.8.2 Relation entre la conductance stomatique et le potentiel osmotique

Étant un paramètre de l'état hydrique de la plante, la CS pourrait ainsi donner une idée de l'état hydrique de la plante. D'où l'intérêt d'étudier sa relation avec le PO. Les valeurs de la CS sont significativement corrélées au PO ($p < 0,01$). Sous les conditions salines, les plantes

ont montré une diminution de leur PO associée à une diminution de la CS moins prononcée que celle enregistrée chez les plantes non stressées (Figure 17).

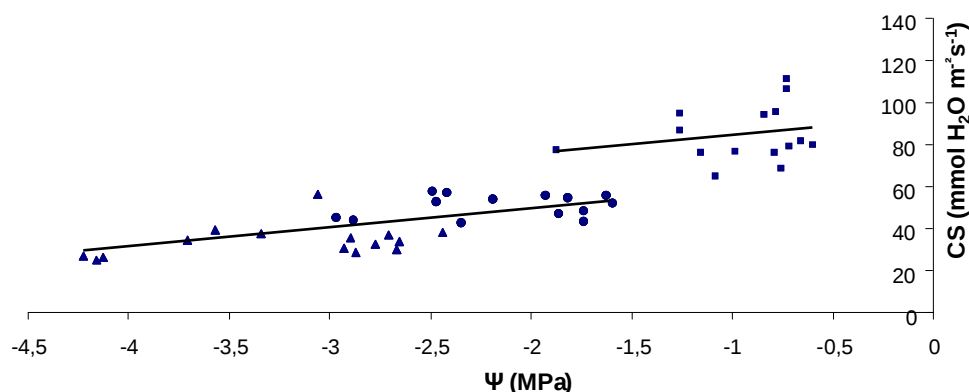


Figure 17. Corrélation de Pearson entre la conductance stomatique (CS en $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et le potentiel osmotique (Ψ en MPa) pour les différentes espèces sous les différents régimes salins : 0 mM NaCl(■), 140mM NaCl(●) et 220 mM NaCl(▲), avec $r=0,35^{**}$ (traitement témoin) et $r=0,47^{**}$ (traitement salin)

2.9 Teneur en ions

La culture sous irrigation saline entraîne un enrichissement des racines et des parties aériennes en Na^+ et Cl^- , avec généralement un excès d'accumulation du cation par rapport à l'anion (Tableau 17). On constate également que l'accumulation des deux ions est plus importante dans les parties aériennes que les racines, et ceci pour tous les écotypes testés. La seconde manifestation du stress salin est une baisse significative des teneurs en K^+ dans les deux parties face à l'accumulation de Na^+ et Cl^- .

a) Evolution de la teneur en sodium (Na^+) partie aérienne

Sur milieu non salin aucune différence significative n'a été enregistrée entre les écotypes testés. Cependant sur les milieux enrichis en NaCl, cette différence a devenu significative ($p<0,01$) et a augmenté avec l'augmentation de la concentration en NaCl. On note que les espèces *T. isthmocarpum*, *T. scabrum* et *L. ornithopodioides* ont accumulé la même concentration en Na^+ , en moyenne 1,16 et 1,33 mmol/g MS respectivement sur 140 mM et 220 mM NaCl. Toutefois, cette dernière reste moins importante que celle accumulée par la variété Paradana. Alors que la forte accumulation de Na^+ a été enregistrée chez les espèces *T. cherleri* et *T. resupinatum*, particulièrement dans la partie aérienne sous les deux traitements salins avec en moyenne 3,67 mmol/g MS.

b) Evolution de la teneur en chlorure (Cl^-)

Même si les espèces *T. isthmocarpum* et *T. scabrum* ont accumulé des concentrations en Na^+ statistiquement identiques à *L. ornithopodioides*, cette dernière a accumulé plus de Cl^- avec 1,82 mmol/g MS sur milieu 220mM NaCl. La variété Paradana a été classée dans le même groupe que les espèces *T. isthmocarpum* et *T. scabrum* sous l'irrigation 140 mM NaCl. Toutefois c'est *T. isthmocarpum* qui a enregistré les faibles concentrations en Cl^- (sauf l'écotype i12) sous le traitement salin 220 mM. Tandis que Paradana arrive en dernier lieu avec une forte accumulation à côté de *T. cherleri* et *T. resupinatum* (en moyenne 2,86 mmol/g MS).

c) Evolution de la teneur en potassium (K^+)

En absence de sel les concentrations en K^+ de tous les écotypes sont statistiquement proches. Sous les deux traitements salins ; une légère supériorité de la teneur en K^+ chez les écotypes i2, i3 et i10 de *T. isthmocarpum* a été décelée par rapport aux autres écotypes, suivis de *T. scabrum* et Paradana. En dernier lieu se sont placés *L. ornithopodioides*, *T. cherleri* et *T. resupinatum*.

d) Rapport des fractions ioniques K^+ / Na^+

Le Tableau 17 donne le rapport des fractions ioniques K^+ / Na^+ dans les racines et les parties aériennes en fonction de la concentration en NaCl. Le rapport K^+ / Na^+ traduit la sélectivité de la plante. Les résultats ont montré que les écotypes avec de plus fortes concentrations en Na^+ dans leurs parties aériennes ont eu les ratios inférieurs. On a noté surtout pour les deux parties aériennes et racinaires, la sélectivité en faveur de K^+ qui a chuté particulièrement sous stress sévère. Quoique, ce sont les écotypes i2, i3 et i10 qui ont présenté le rapport K^+ / Na^+ le plus élevé.

Tableau 17. Concentrations (mmol/g MS) des ions Na⁺, K⁺ et Cl⁻ des parties aérienne (A) et racinaires (R) et le rapport de sélectivité K⁺/Na⁺ de la partie aérienne des quinze écotypes, mesurées à la fin de la période expérimentale pour les différents traitements. Les moyennes de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% du test LSD.

Écotypes	0mM de NaCl							140mM de NaCl							220 mM de NaCl						
	Na ⁺		Cl ⁻		K ⁺		K ⁺ /Na ⁺	Na ⁺		Cl ⁻		K ⁺		K ⁺ /Na ⁺	Na ⁺		Cl ⁻		K ⁺		K ⁺ /Na ⁺
	A	R	A	R	A	R		A	R	A	R	A	R		A	R	A	R	A	R	
ch5	1,19a	0,06a	0,25a	0,14a	1,07a	0,94a	0,90b	1,44a	0,86a	0,70a	0,83a	0,98b	0,84a	0,68b	3,47a	2,63a	2,43a	2,32a	0,38c	0,26b	0,11d
ch19	1,19a	0,09a	0,20a	0,10a	1,06a	0,88a	0,89b	2,14a	0,74a	0,75a	0,87a	0,76c	1,03a	0,36c	4,17a	2,77a	2,38a	2,28a	0,16c	0,45a	0,04d
ch20	1,14a	0,11a	0,22a	0,10a	1,07a	0,91a	0,94b	1,69a	0,83a	0,77a	0,88a	0,83c	0,66b	0,49c	3,72a	2,86a	2,40a	2,28a	0,23c	0,08c	0,06d
i1	1,16a	0,08a	0,20a	0,10a	1,06a	0,89a	0,91b	1,12b	0,60a	0,45b	0,39b	0,98b	0,55c	0,88b	1,23b	0,50b	0,70c	1,07b	0,90b	0,46a	0,73ab
i2	1,05a	0,05a	0,18a	0,15a	1,57a	1,01a	1,50a	1,12b	0,57a	0,45b	0,27b	1,36a	0,95a	1,21a	1,19b	0,16b	0,96c	2,41a	1,14a	0,79a	0,96a
i3	1,07a	0,04a	0,17a	0,15a	1,52a	0,94a	1,42a	1,17b	0,64a	0,47b	0,25b	1,32a	0,85a	1,13a	1,36b	0,83b	0,66c	1,04b	1,21a	0,74a	0,89a
i6	1,14a	0,08a	0,21a	0,10a	1,08a	0,91a	0,95b	1,96a	0,82a	0,73a	0,22b	0,98b	0,63b	0,50c	2,32a	1,91a	0,52c	0,41b	0,87b	0,52a	0,38c
i10	1,07a	0,05a	0,18a	0,15a	1,09a	0,96a	1,02b	1,19b	0,57a	0,43b	0,36b	1,28a	0,66b	1,08a	1,38b	0,76b	0,62c	1,06b	1,17a	0,55a	0,85a
i12	1,02a	0,05a	0,18a	0,17a	1,10a	0,94a	1,0b	1,21b	0,59a	0,43b	0,30b	0,96b	0,76b	0,79b	1,40b	0,78b	1,17b	2,36a	0,85b	0,65a	0,61b
Paradana	1,07a	0,10a	0,16a	0,12a	1,01a	0,67a	0,94b	1,48a	0,72a	0,58b	0,25b	0,91b	0,39d	0,61b	3,22a	2,75a	2,61a	2,47a	0,70b	0,18b	0,22c
r8	1,17a	0,09a	0,16a	0,12a	1,21a	0,65a	1,03b	1,57a	0,82a	0,76a	0,29b	0,99b	0,49c	0,63b	3,33a	2,85a	3,49a	2,44a	0,78b	0,28b	0,23c
sc1	1,10a	0,07a	0,18a	0,13a	0,91a	0,96a	0,83c	1,15b	0,66a	0,33b	0,44b	0,87b	0,79b	0,76b	1,28b	0,79b	1,34b	0,96b	0,27c	0,41a	0,21c
sc3	1,14a	0,08a	0,19a	0,14a	0,86a	0,91a	0,75c	1,19b	0,63a	0,34b	0,29b	0,90b	0,74b	0,76b	1,32b	0,66b	1,37b	2,32a	0,30c	0,46a	0,23c
o9	1,15a	0,07a	0,12b	0,08a	0,81a	0,61a	0,70c	1,18b	0,73a	0,67a	0,47c	0,79c	0,10d	0,67b	1,40b	0,58b	1,88b	1,64a	0,76b	0,49a	0,54b
o16	1,03a	0,06a	0,16a	0,12a	0,98a	0,64a	0,95b	1,15b	0,73a	0,63a	0,46b	0,80c	0,30d	0,70b	1,35b	0,42b	1,76b	1,92a	0,68b	0,45a	0,50b

2.10 Teneur foliaire en sucres solubles totaux et en proline

L'interaction écotype-traitement est significative ($P < 0,001$) pour la teneur en sucres solubles totaux et non significative pour celle en proline. Leur variation avec le temps est également significative ($P < 0,001$).

Les plantes soumises aux deux stress salins ont produit plus de sucres solubles totaux (SST) que celles sous irrigation non saline. Au début de l'essai, les concentrations en SST (Figure 18) varient en moyenne entre 21,4 mg/g de MF sur milieu témoin, 35,6 mg/g de MF sur 140 mM NaCl et 54,5 mg/g de MF sur 220 mM NaCl. Au milieu de l'essai, les concentrations ont augmenté en moyenne de 36% pour 140 mM et 52% pour 220 mM NaCl par rapport au témoin. Avec la progression du temps, c'est l'espèce *T. scabrum* qui a montré les concentrations en SST les plus élevées tout au long de l'essai pour les deux stress salins. A la fin des essais salins elle a enregistré en moyenne 90 mg/g de MF. Au contraire, *T. resupinatum* est celle qui a eu la faible accumulation des SST sur milieux salins, avec en moyenne 56,5 mg/g de MF. Les autres espèces ont montré des valeurs intermédiaires. A noter que les écotypes i1, i2, i3, i10 et la variété Paradana ont gardé les valeurs des concentrations en SST statistiquement stables entre T2 et T3 sur 140 mM de NaCl.

Les teneurs foliaires en proline (Figure 19) ont augmenté en fonction du temps pour les trois types de traitement. Toutefois l'évolution a été beaucoup plus importante pour les essais salins. On a passé de 8 mg/g de MF à 12 mg/g de MF en moyenne respectivement à 140 mM et 220 mM, avec un taux moyen d'augmentation de l'ordre de 63% à la fin de l'essai par rapport au témoin.

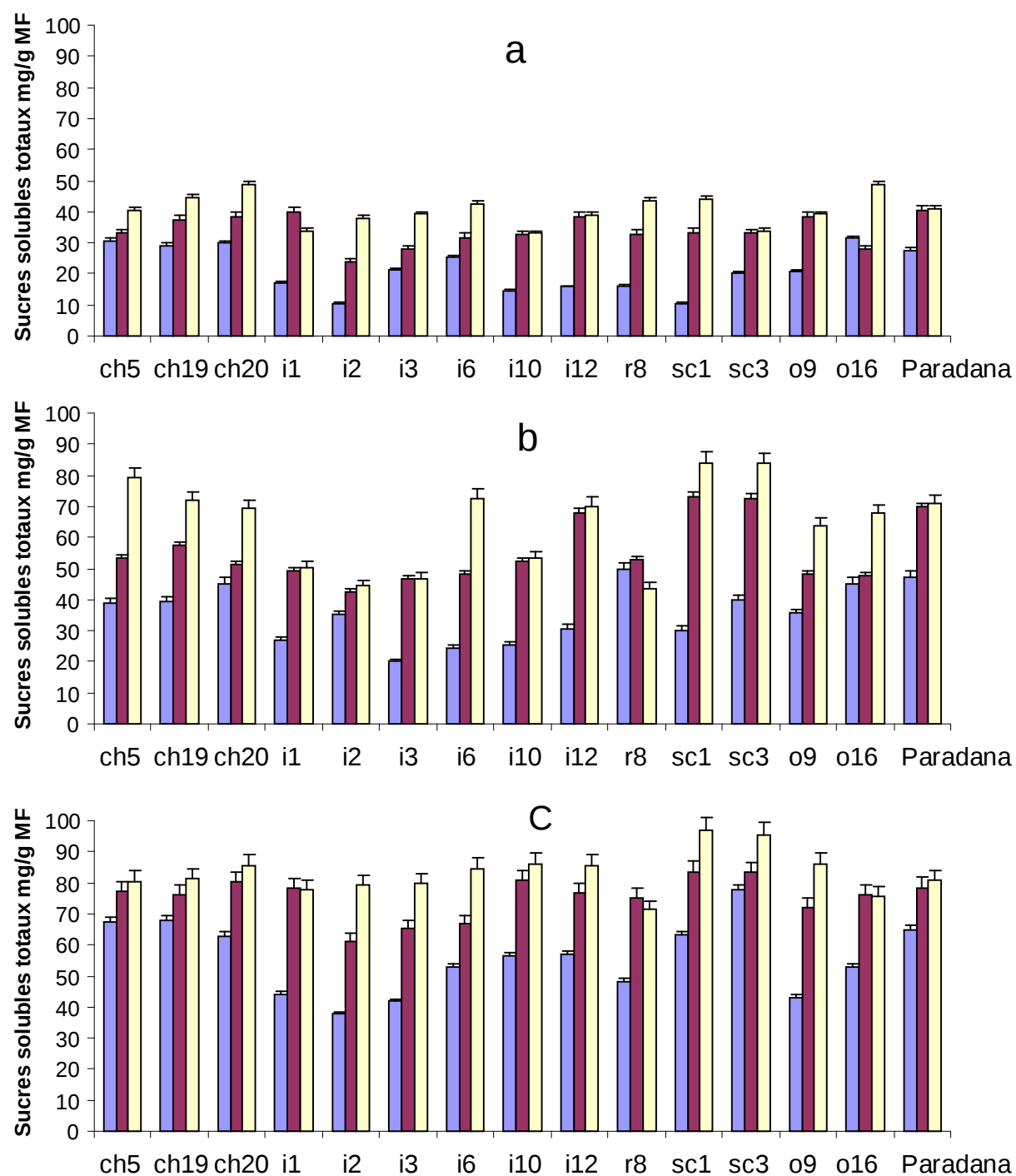


Figure 18. Evolution de la teneur en sucres solubles totaux (mg/g MF) des écotypes de trèfle et de lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (140 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

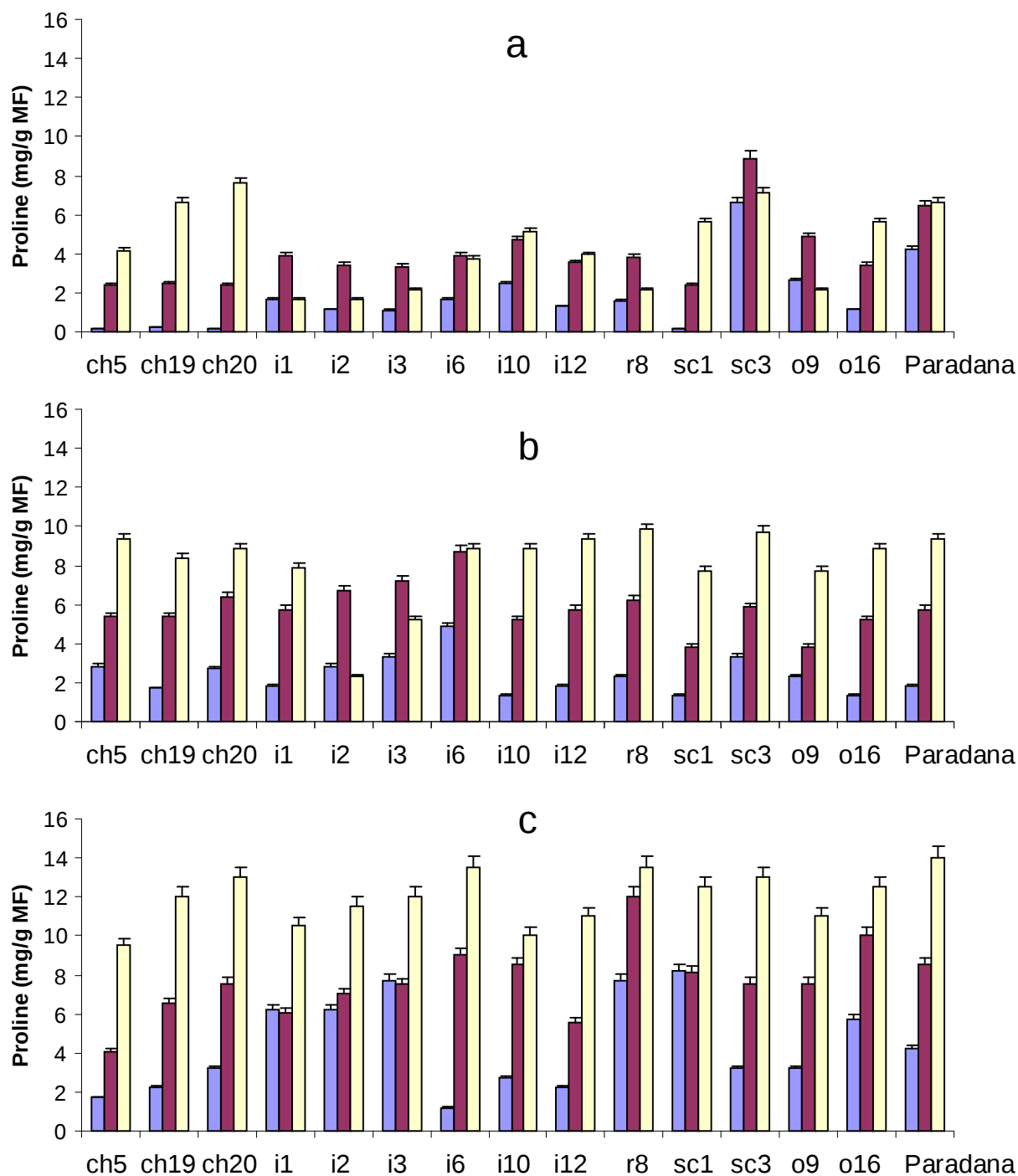


Figure 19. Evolution de la teneur en proline (mg/g MF) des écotypes de trèfle et de lotier sous les différents régimes salins : a (0 mM NaCl), b (140 mM NaCl) et c (220 mM NaCl) prise en trois temps différents T1 (4 semaines), T2 (8 semaines) et T3 (12 semaines). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

2.11 Étude de la relation entre les paramètres étudiés

Le tableau 18 résume les coefficients de corrélation entre les différents paramètres étudiés. On constate qu'il existe une corrélation significative négative entre PO et la teneur foliaire en Na^+ et Cl^- et positive avec les SST. Alors que la TRE est non corrélée avec Na^+ et Cl^- mais

elle est corrélée positivement avec PO et les SST. La SF est positivement corrélée avec le rendement en MSA ainsi qu'avec l'IS. Les corrélations les plus importantes ont été enregistrées entre le rapport K^+/Na^+ et CMR et entre la teneur foliaire en K^+ et la conductance stomatique (CS).

Tableau 18. Coefficients de corrélation entre les différents paramètres testés pour les trois traitements salins. *** ; ** ; * Les coefficients sont significatifs respectivement à $P \leq 0,001$, $P \leq 0,01$ et $P \leq 0,05$

	SF	MSA	MSR	IS	CMR	TRE	PO	CS	Na^+	Cl^-	K^+	K^+/Na^+	Pro	SST
SF	1	0,51**	0,59	0,53*	0,65	0,67	0,87	-0,57	-0,59	0,69	0,59	0,60	0,70	0,80
MSA		1	0,51	-0,41	0,42	0,76	0,84	-0,52	0,57	0,34	0,68	0,56	-0,56	-0,41
MSR			1	0,87	0,64	0,65	0,81	0,50	-0,56	-0,44	0,84	0,47	0,35	0,35
IS				1	0,89	0,41*	0,78	0,55	0,56	0,41	0,64	0,87	0,35	0,35
CMR					1	0,81	0,58	0,59	0,79	0,44	-0,58	0,83***	0,35	0,35
TRE						1	0,44	0,67	0,44	0,82	0,45	0,65	0,30	0,36*
PO							1	0,69**	0,41**	0,56**	0,50	0,65	0,84	0,75**
CS								1	0,59	0,80	0,93**	0,50	0,56	0,85
Na^+									1	0,74	0,78	0,50	0,38	0,32*
Cl^-										1	0,35	0,82	0,52	0,21*
K^+											1	0,80	0,24	-0,20
K^+/Na^+												1	0,96	-0,20
Pro													1	0,44
SST														1

3. Discussion

3.1 Rendement en matière sèche et surface foliaire

La concentration 140 mM NaCl a été insuffisante pour causer une réduction relative de 50 % de MS par rapport aux témoins (0 mM), sauf pour les espèces *T. cherleri* et *T. resupinatum*. On signale que ce seuil -50 %– est très utilisé pour le classement de la tolérance des plantes (Rochdi *et al.*, 2005). Par contre, la concentration 220 mM NaCl appliquée peut être utilisée pour la discrimination entre les écotypes, puisqu'elle a entraîné des réductions plus marquées. On a également noté une réduction de MSA de l'ordre de 38% et 44% respectivement pour les écotypes i2, i3, o9 et o16 ; et aux alentours de 58% pour les écotypes ch5, ch19 et ch20. Ainsi on peut classer ces derniers écotypes comme sensibles. La corrélation positive ($r=0,51$) entre SF et rendement en MSA laisse penser que la diminution sévère de la production de MSA chez les écotypes r8, ch5, ch19 et ch20, par rapport aux autres, peut être liée à la réduction de l'expansion foliaire ainsi que l'élimination d'une partie de feuillage par sénescence prématurée. Toutefois, toute réduction de la surface foliaire cause une réduction de la surface photosynthétique, ainsi moins de production de biomasse. Ce qui peut expliquer en partie la faible production en MSA enregistrée chez ces écotypes. La MSR a été moins affectée par la salinité que la MSA chez toutes les espèces ; sauf pour *L. ornithopodioides*

chez qui la partie racinaire a été plus affectée que la partie aérienne réduite de 68%. Ainsi, la plante semble s'adapter au stress salin en réduisant en premier lieu son système racinaire préservant la partie aérienne devant maintenir et assurer la production de photosynthétats (Rubinigg *et al.*, 2004).

3.2 Teneurs en ions

Les espèces *T. isthmocarpum* et *T. scabrum* ont accumulé moins de Cl^- par rapport à *L. ornithopodioides* et la même concentration en Na^+ . Toutefois leur teneur en ces ions ont été faibles par rapport aux *T. cherleri*, *T. resupinatum* et la variété Paradana, particulièrement sur 220 mM NaCl. Il s'avère ainsi que les espèces *T. isthmocarpum* et *T. scabrum* ont développé un système d'exclusion de Cl^- comme mécanisme de tolérance au sel. L'exclusion importante de Cl^- par *T. isthmocarpum* et *T. scabrum* peut être expliquée par une plus grande accumulation dans les vacuoles des cellules racinaires (par exemple par l'intermédiaire du symport Cl^-/H^+) (Shaoliang *et al.*, 2002). Ou bien par la réduction du chargement de Cl^- dans le xylème (par exemple, la récupération de Cl^- dans les cellules du parenchyme des racines). Récemment, un gène OsCCC1 a été identifié chez *Oryza* codant pour un transporteur du Cl^- et qui peut être un éventuel gène pour la récupération du Cl^- à partir des vaisseaux du xylème (Kong *et al.*, 2011). D'ailleurs, la comparaison de l'expression de ce gène dans les feuilles de deux génotypes d'*Oryza* (différents par rapport à l'exclusion de Cl^-) en réponse à des concentrations élevées en cet ion, a révélé que l'OsCCC1 (orthologue) a eu une expression accrue au fil du temps (12 semaines) pour le génotype accumulant le Cl^- , mais pas pour le génotype excluant le Cl^- (Shia *et al.*, 2013). Cependant, le mécanisme exact de l'exclusion de Cl^- reste encore non clair.

La tolérance à la salinité des espèces *T. isthmocarpum*, *T. scabrum* et *L. ornithopodioides* semble s'expliquer aussi par une bonne sélectivité vis-à-vis du potassium vu leur rapport K^+/Na^+ élevé voisin de 1. En effet, dans les conditions salines les ions Na^+ et K^+ entrent en concurrence d'absorption à travers la membrane plasmique des cellules végétales. Comme K^+ est un élément essentiel, le maintien de sa concentration dans le cytoplasme est une composante importante de la tolérance au sel (Maathuis et Amtmann, 1999). *T. isthmocarpum* a montré sur 220 mM le rapport le plus élevé particulièrement les écotypes i1, i2, i3 et i10 de l'ordre de 0,7 en moyenne. Si on compare à une étude de *Medicago sativa* (la légumineuse fourragère la plus utilisée), Isla et Aragüés (2009) ont trouvé que cette dernière montre un K^+/Na^+ sur 160 mM de l'ordre de seulement 0,58. Ceci pousse à penser que *T. isthmocarpum* peut être une nouvelle espèce à exploiter.

D'autre part on a noté une forte accumulation des ions Na^+ et Cl^- chez les espèces *T. cherleri* et *T. resupinatum*, particulièrement dans la partie aérienne sous les deux traitements salins. En effet, la capacité d'inclure des sels est considérée comme étant un trait de tolérance au sel quand elle est accompagnée par la capacité des plantes à compartimenter le NaCl dans la vacuole, protégeant ainsi les enzymes sensibles au sel dans le cytoplasme (Teakle *et al.*, 2006). Apparemment, ces espèces ont été incapables de séquestrer efficacement les ions Na^+ et/ou Cl^- . Les sels se sont accumulés et devenus toxiques conduisant à une inhibition de leur croissance. L'importante corrélation obtenue entre le rapport K^+/Na^+ et CMR illustre ce constat. Elle montre que toute augmentation de la teneur en ions Na^+ pourrait engendrer une baisse de la croissance et par conséquent une réduction de la production de MS manifestée chez ces deux espèces. On peut également lier la réduction de la SF très marquée chez *T. cherleri* et *T. resupinatum* sur 220 mM à leur teneur en ions. En effet, l'augmentation des concentrations en Cl^- et en Na^+ dans les feuilles, causent la réduction de l'expansion des feuilles (Munns, 1993 ; Rochdi *et al.*, 2005). Ce qui suggère que cette accumulation des ions Na^+ et Cl^- peut causer une baisse de la photosynthèse et ainsi de la productivité de ces deux espèces. Kulaeva et Prokoptseva (2004) rapportent que Na^+ et Cl^- altèrent le métabolisme et les sites de réception des hormones impliquées dans la division et l'expansion cellulaire. Ce qui accélère la sénescence et limite la formation de nouvelles feuilles photosynthétiquement actives.

3.3 Paramètres physiologiques

En examinant l'indice de succulence on a constaté que les espèces *T. cherleri*, la variété Paradana et les écotypes i3 et i10 de *T. isthmocarpum* qui ont connu une grande réduction de leur surface foliaire, ont enregistré l'indice de succulence le plus élevé, particulièrement sur le régime salin 220 mM. Il s'agit alors d'une forme d'adaptation de la plante qui essaye d'augmenter sa capacité de rétention en eau par diminution de l'expansion foliaire et par conséquent de la transpiration (amélioration de l'hydratation des parties aériennes).

Le PO a diminué progressivement et différemment avec le temps pour tous les écotypes. Ceci met en évidence des phases où existe une augmentation de la concentration cellulaire des solutés osmotiquement actifs (osmolytes) qui apportent un nouvel état d'équilibre permettant aux plantes de maintenir la turgescence. Aucune corrélation n'a été détectée entre la proline et PO, ce qui peut indiquer qu'elle n'intervient pas dans l'ajustement osmotique. Tandis qu'on a noté une corrélation positive entre PO et sucres solubles ($r=0,75$). L'effet dépressif de la salinité sur la croissance des écotypes testés peut avoir deux causes principales. D'une part, les difficultés d'alimentation en eau et en nutriments, et d'autre part la toxicité des ions

accumulés en excès dans la plante (Morant-Manceau *et al.*, 2004). Les résultats ont montré que tous les écotypes de *T. cherleri* ont présenté un bon ajustement osmotique particulièrement sur milieu moyennement salin avec $PO = -2,04$. L'hydratation des plantes ayant toujours été maintenue sensiblement égale à celle des témoins ($p < 0,05$). Ainsi, on peut exclure que l'effet inhibiteur de NaCl sur leur croissance passe par une perturbation de leur alimentation en eau. Par contre, l'espèce *T. resupinatum* (r8) a enregistré sous les deux traitements salins les faibles valeurs de TRE des feuilles par rapport aux autres espèces, tout au long de la période expérimentale. Ainsi qu'une chute de son PO. Ce qui prouve son incapacité à contrôler son hydratation sous irrigation saline. Le sel semble perturber son alimentation hydrique. Certains auteurs ont constaté que l'exposition au NaCl à long terme affecte la perméabilité des racines (Henzler *et al.*, 2000), par conséquent une diminution de TRE. Sa faible accumulation des sucres solubles sur milieux salins, soutient l'hypothèse de mauvaise osmo-régulation.

La variété Paradana semble adopter un système d'inclusion de Na^+ probablement en compartimentant le Na^+ dans les vacuoles des cellules foliaires. En effet le Na^+ peut être utilisé comme un osmoticum pour abaisser le potentiel osmotique nécessaire pour le maintien de l'état hydrique des plantes. Cependant, sur milieu sévèrement salin Paradana ne contrôle plus ce mécanisme, et les concentrations de Na^+ deviennent toxiques. Un constat tenu par l'apparition des symptômes de la toxicité foliaire

T. isthmocarpum assure son ajustement osmotique grâce aux ions K^+ , particulièrement les écotypes i2, i3 et i10. Cet ion apparaît avoir une plus grande participation quantitative dans l'ajustement osmotique des feuilles. Et ceci par une meilleure sélectivité K^+/Na^+ qui permet de limiter les exportations de Na^+ vers les limbes et maintenir une forte sélectivité de K^+ dont la concentration n'a diminué avec le temps que relativement lentement. Le potassium est un nutriment qui peut jouer un rôle important dans de nombreux processus tel que l'homéostasie d'ions des cellules végétales ainsi que l'ajustement osmotique durant l'ouverture et la fermeture stomatique (Barbieri *et al.*, 2012). La corrélation positive entre la teneur en K^+ et la conductance stomatique ($r = 0,93$) démontre ce fait. La bonne osmorégulation de *T. isthmocarpum* permet le maintien de la turgescence ce qui permet de conserver la transpiration qui s'oppose à la fermeture des stomates. *L. ornithopodioides* assure le même mécanisme mais à une moindre mesure.

T. scabrum a montré à son tour une bonne osmorégulation. Toutefois le nombre de SST est le plus élevé chez cette espèce sous les deux irrigations salines et tout au long de la période expérimentale. On a également noté une accumulation de SST très importante face à

une diminution de K^+ . Paridaa et Bandhu (2005) ont déterminé chez *Vicia faba* que les sucres contribuent à l'augmentation de la pression osmotique foliaire lorsque le contenu en K^+ est faible, ce qui permet l'ouverture stomatique. On peut dire que *T. scabrum* régule son PO interne par la synthèse d'osmoprotecteurs : les sucres solubles.

4. Conclusion

Le résultat intéressant de cette étude est la performance de *T. isthmocarpum* par rapport aux autres espèces ainsi qu'à la variété commerciale Paradana. Cette performance se manifeste de point de vue rythme de croissance et rendement en biomasse aussi bien sur milieu non salin que sous irrigation saline arrivant à 220 mM de NaCl. On a également pu proposer un mécanisme de tolérance adoptée par cette espèce. Néanmoins, on a mis en évidence la sensibilité à la salinité de l'espèce *T. cherleri* durant le stade végétatif malgré qu'elle a été la plus tolérante à la salinité durant le stade germinatif (Partie A).

Ainsi trois groupes d'écotypes ont pu être identifiés :

Groupe 1 : les écotypes i1, i2, i3 et i10 ; la croissance est forte et les feuilles ont accumulé les teneurs les plus élevées en K^+ . Le PO et la TRE ont diminué avec la progression du stress salin et leur accumulation en SST est moyenne. Toutefois la déshydratation n'a pas affecté leur survie. Ces écotypes sont considérés tolérants à la salinité.

Groupe 2 : i6, o9, o16, la variété Paradana, sc1 et sc3 chez qui une forte chute de la TRE et du PO ainsi qu'une forte accumulation des SST. Ils sont considérés moyennement tolérants à la salinité.

Groupe 3 : i12, r8, ch5, ch19 et ch20 chez qui la TRE des feuilles a atteint des seuils létaux. L'accumulation des SST et de la proline est moins importante avec une forte accumulation des ions Na^+ et Cl^- et un faible rapport K^+/Na^+ . Ces écotypes sont considérés sensibles à la salinité.

CHAPITRE 4

*Étude de l'influence de la salinité en plein
champ sur le comportement et la teneur en
phytoestrogènes d'écotypes de trèfles et
lotier sélectionnés pour leur tolérance au
sel*

1. Introduction

La plupart des études de tolérance des plantes au stress salin ont été réalisées sous serre sous conditions contrôlées. L'étude en milieu de culture réel est une étape nécessaire pour vérifier les résultats de l'étude sous serre. Une étude sur *Melilotus spp.* a montré une bonne corrélation entre les résultats obtenus sous serre et sur le terrain (Rogers *et al.*, 2008). Ceci suggère que les études en serre sont une première étape utile dans l'identification du matériel végétal tolérant la salinité. Ainsi, identifier les espèces prioritaires ou les génotypes pour l'évaluation dans le champ. Bien qu'il soit difficile de généraliser les résultats obtenus dans des conditions contrôlées directement sur le terrain, où les salinités des sols peuvent varier considérablement tout au long d'un cycle d'irrigation (Rogers *et al.*, 2009). D'autre part, la capacité des plantes à surmonter le stress salin est associée à des caractéristiques morphologiques, et à des activités physiologiques et biochimiques (Çiçek et Çakırlar, 2008). Cette dernière se manifeste, à une certaine mesure, par son induction de la chute du taux d'assimilation du CO₂ dans les feuilles (Hajlaoui *et al.*, 2006). Cette limitation de la photosynthèse provoque une réduction de la chaîne d'électrons photosynthétiques, ce qui favorise la production des dérivés réactifs de l'oxygène nuisibles à la croissance des plantes (Stepien et Johnson, 2003). Afin de réduire les dommages de cette oxydation résultante du stress salin, les plantes ont différents mécanismes d'adaptation à travers une cascade d'antioxydants. Dans ce cas, des composés polyphénoliques jouent un rôle important en piégeant les radicaux libres (Ksouri *et al.*, 2007). Parmi ces composés polyphénoliques figurent les phytoestrogènes, qui sont notamment synthétisés par les légumineuses. Les composés oestrogéniques les plus importants des légumineuses sont les isoflavones et les coumestanes. Par exemple, le trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum*) peut contenir jusqu'à 5% (MS) d'isoflavones oestrogéniques, comprenant la génistéine, la formononétine et la biochanine A (Vetter, 2004). Néanmoins, à des doses élevées, les phytoestrogènes ont été associés à l'infertilité chez les animaux (Shackell *et al.*, 1993). En outre, le fourrage contenant des œstrogènes à des niveaux élevés peut entraîner chez les ruminants (les bovins et les ovins) l'hyperoestrogénie, avec la nymphomanie, des kystes ovariens, et le gonflement des organes génitaux (Wang *et al.*, 2002). A signaler que les isoflavones sont présentes uniquement dans le trèfle vert, et disparaissent à la sénescence (Adams, 1995). D'où vient l'intérêt de la présente étude dont les objectifs sont :

- Étudier l'interaction génotype x environnement tout au long du cycle végétatif depuis la germination jusqu'à la fructification.
- Déterminer la productivité des écotypes sélectionnés en plein champ.
- Évaluer l'effet de la salinité sur la phase reproductive.
- Dédire l'effet de la salinité sur la synthèse des phytoestrogènes nuisibles aux ruminants, tout en comparant la teneur des écotypes testés en ces composés phénoliques.

2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel végétal

Le matériel végétal est composé de 9 écotypes de *Trifolium* et *Lotus* sélectionnés sur la base des essais de salinité sous serre. Il s'agit des écotypes : i1, i2, i3, i6, i10, sc1, sc3, o9 et o16 ; en plus de la variété Paradana de l'espèce *T. michelianum*.

2.2 Sites expérimentaux

L'étude a été effectuée de décembre 2009 à avril 2010 dans deux sites : la station expérimentale de Guich à l'INRA de Rabat (caractéristiques voir chapitre 2) comme milieu témoin, et Carrière de Benabid située dans la commune rurale de Dar Bouazza (20 Km de Casablanca). L'eau d'irrigation (puits) de ce site est affectée par le problème de la salinité, ce qui fait de cette région un site représentatif de l'étude de l'interaction écotypes-milieu. Le site Carrière de Benabid se situe à 22 Km au Sud-Ouest de Casablanca, à 33,51 de latitude et - 7,81 de longitude. Le sol est de type argilo-sablonneux, de pH 7,5, moyennement riche en matière organique (2,28%), avec des teneurs suffisantes en phosphore (222,48 ppm) et en potassium (386,56 ppm). La pluviométrie moyenne annuelle est aux alentours de 480 mm/an.

2.3 Protocole expérimental

Le semis a été effectué manuellement le 8 décembre au site de Carrière de Benabid et le 9 décembre au Guich à raison de 1,5 g/m². Le dispositif expérimental a été en blocs complètement randomisés avec trois répétitions, les parcelles élémentaires sont de 1 m² contenant chacune 24 plantes après démariage. L'espace entre les parcelles a été de 1 mètre et l'espace entre les deux blocs a été de deux mètres. L'eau d'irrigation utilisée est celle du puits servant habituellement pour l'irrigation des parcelles de cultures. La fréquence d'irrigation

était la même : 10 jours au début de la culture et deux fois par semaine dès le début du stade quatre feuilles. L'eau d'irrigation au Carrière de Benabid est caractérisée par une salinité de l'ordre de 10,9 ds/m (CE), alors que celle de l'eau d'irrigation non saline est de l'ordre de 0,56 ds/m.

2.4 Mesures et observations effectuées

2.4.1 La floraison

Elle correspond à la date d'apparition de 50% de fleurs ouvertes et exprimée en nombre de jours à partir de la date de semis.

2.4.2 Rendement en matière sèche

Le rendement en matière sèche a été mesuré au stade de floraison. Les plantes ont été coupées et pesées fraîches. 500 g de matière verte de chaque parcelle a été prélevée et séchée à l'étuve pendant 72h à 70°C pour déterminer le poids sec.

2.4.3 Sucres solubles totaux

Des jeunes feuilles de chaque échantillon ont été coupées après 4, 8 et 12 semaines, du début des traitements, et mises immédiatement dans l'azote liquide afin de doser les SST. Le dosage des SST a été déterminé par la méthode de Schields et Burnett améliorée par Buysse et Merckx (1993). A 100 mg de matière fraîche aérienne a été ajouté 3ml d'éthanol à 80%. L'ensemble a été mis dans un bain Marie à 80 °C pendant 30 mn pour faire évaporer l'alcool. Après refroidissement, 1 ml de l'extrait a été prélevé auquel on a ajouté 1 ml de solution de phénol à 5%. Après agitation soigneuse, 5 ml d'acide sulfurique a été ajouté puis on a procédé à une agitation rapide (agitateur vortex). L'ensemble a été maintenu pendant 45mn à 5°C puis incubé pendant 30mn à l'obscurité. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à une longueur d'ondes de 485 nm. Les résultats des densités optiques ont été rapportés sur une courbe étalon des sucres solubles (exprimée en glucose).

2.4.4 Potentiel osmotique

Des jeunes feuilles de chaque échantillon ont été coupées après 4, 8 et 12 semaines du début des traitements et mises immédiatement dans l'azote liquide et conservées à -70°C. Le PO a été mesuré par des psychromètres (L-51, Wescor, USA). Les feuilles ont été

décongelées en les plaçant à 20°C. Le papier filtre imbibé de sève protoplasmique provenant des cellules éclatées des feuilles a été mis dans la chambre psychrométrique. La lecture en microvoltmètre (transformé en Méga pascal (MPa), a été effectué dans le microvoltmètre HR-33T dew point (Wescor, USA) après une période de 15 à 20 mn, période nécessaire à la stabilisation de la température dans la chambre du psychromètre.

2.4.5 Teneur en azote

Chez les légumineuses, les effets délétères du stress salin s'exercent notamment sur le métabolisme azoté ce qui explique la mesure de ce paramètre. L'azote des plantes a été déterminé par la méthode de Kjeldahl (1983), qui consiste en une minéralisation de 2g de la matière végétale par l'acide sulfurique concentré (20ml) à chaud en présence d'un catalyseur de minéralisation à base de sélénium, de sulfate de potassium et de sulfate de cuivre pour augmenter la température d'ébullition de l'acide, puis porter à l'ébullition pour transformer l'azote organique en sulfate d'ammonium. L'ammonium ainsi obtenu est dosé par titration avec l'acide sulfurique dilué (N/50) en présence du réactif de Tashiro en tant qu'un indicateur de coloration.

2.4.6 Taux de germination final

Ce paramètre a été mesuré afin de déterminer la capacité de la plante à se reproduire après sa culture sous des conditions salines. Les graines en nombre de 20, de chaque écotype issu des essais témoin et salin ont été scarifiées puis désinfectées. Les graines ont été ensuite mises à germer dans des boîtes de pétri sur un milieu gélosé à 1% d'agar. Le taux est exprimé par le rapport nombre de graines germées sur nombre total de graines : $TG = (n/N) \times 100$

n : nombre de graines germées

N : nombre total de graines mises en germination

2.4.7 Teneur en polyphénols

La procédure d'extraction utilisée est celle décrite par Oleszek et Stochmal (2002). 5 g des échantillons de feuilles lyophilisées ont été extraits avec 100 ml de méthanol (70%) par la suite avec 100 ml d'acétone (70%) à 4°C. Les extraits ont été filtrés, agités puis centrifugés à 15000g pendant 15 min, ensuite lavés par le dichlorométhane pour éliminer les chlorophylles

et les traces de lipides. La phase aqueuse obtenue a été évaporée et le résidu a été pris dans le méthanol absolu. La quantité des phénols solubles a été déterminée à partir de l'extrait ainsi obtenu, et ce par l'UPLC (Annexe 4). Pour chaque espèce, trois extractions et purifications indépendantes ont été réalisées au stade végétatif, et les données ont été présentées par des valeurs moyennes avec leurs écarts types.

2.5 Analyses statistiques

Le programme Systèmes d'Analyses Statistiques (SAS, Inc., Cary, North Carolina, USA) a été utilisé pour réaliser les analyses de la variance, la comparaison des moyennes et les corrélations.

3. Résultats

3.1 Conditions climatiques

Les précipitations enregistrées au site Benabid en 2009/2010 n'ont pas dépassé 373 mm. La répartition des pluies a été irrégulière, la moitié des précipitations est concentrée sur les deux mois d'octobre et février. On note également un arrêt précoce des pluies depuis le mois de mars accompagné de températures élevées.

3.2 Précocité de la floraison (F)

Sur milieu témoin (Guich), aucune différence significative n'a été enregistrée entre les écotypes étudiés. La durée du cycle végétatif a été en moyenne de 89 jours (Tableau 19). Sur milieu salin (Benabid), l'analyse de la variance a révélé un effet significatif de la floraison des écotypes ($p < 0,001$). Tous les écotypes de *T. isthmocarpum* n'ont enregistré aucune différence avec leurs témoins sur Guich. Par contre les écotypes o9 et o16 se sont montrés les plus tardifs. Ils ont fleuri 28 jours après la floraison de leurs témoins sur Guich (Figure 20).

Tableau 19. Floraison des écotypes de trèfle et lotier et la variété Paradana sur les sites Guich (Témoin) et Benabid (Salin)

Écotypes	Floraison (jours)		Précocité	
	Guich	Benabid	Guich	Benabid
i1	87	88	Précoce	Précoce
i2	87	89	Précoce	Précoce
i3	87	89	Précoce	Précoce
i6	91	90	Précoce	Précoce
i10	89	89	Précoce	Précoce
sc1	87	112	Précoce	Semi précoce
sc3	87	112	Précoce	Semi précoce
o9	93	121	Précoce	Tardive
o16	93	121	Précoce	Tardive
Paradana	89	102	Précoce	Semi précoce
LSD	1,9	6,1		



a



b

Figure 20. Essais Guich (a) et Benabid (b) au stade floraison

3.3 Rendement en matière sèche (MS)

Le tableau 20 présente les rendements en MS (g/m^2) pour l'ensemble d'écotypes. L'analyse de variance a révélé une différence significative entre les écotypes et de l'interaction écototype-essai ($p < 0,001$).

Pour l'essai Guich, les meilleurs rendements ont été obtenus par les écotypes i1, i3, i10 et la variété Paradana en dépassant la moyenne générale (856 g/m^2). Tandis que les écotypes sc1 et sc3 ont exhibé les rendements les plus faibles en moyenne 253 g/m^2 (Tableau 19).

Pour l'essai Benabid, les espèces *T. isthmocarpum* et *T. scabrum* ont enregistré des rendements statistiquement similaires à leurs témoins sur Guich. Tandis que les écotypes o9 et o16 et la variété Paradana ont vu leur rendements chuter de 47%, 40% et 33% respectivement par rapport à leurs témoins. Le rendement en MS de *T. isthmocarpum* a dépassé celui de la variété Paradana.

Tableau 20. Rendement en matière sèche (g/m²) sur les sites Guich (Témoin) et Benabid (Salin). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions

Ecotypes	Rendement en matière sèche (g/m ²)	
	Guich	Benabid
i1	1220,76	1009,51
i2	860,45	824,64
i3	1065,39	897,56
i6	805,75	920,22
i10	1183,08	916,62
sc1	222,58	190,23
sc3	283,08	272,45
o9	900,41	474,44
o16	781,90	468,65
Paradana	1242,87	831,94
Moyenne	856,62	660,63
LSD	4,70	3,08

3.4 Sucres solubles totaux (SST)

L'analyse de la variance a révélé un effet non significatif de l'interaction écotype-essai. Au début de leur croissance (T1), les concentrations des SST ont oscillé entre 24 et 39 mg/g de MF en moyenne (Figure 21). Au milieu de l'essai (T2) les concentrations en SST ont augmenté de 39% en moyenne sur le site Benabid. Toutefois pour les deux essais c'est l'espèce *T. scabrum* qui a montré les concentrations en SST les plus élevées tout au long de l'expérience. Après 12 semaines de l'essai (T3), les écotypes ont accumulé des valeurs proches en SST dans leurs feuilles.

3.5 Potentiel osmotique (PO)

L'évolution du PO des feuilles a été hautement significative ($P < 0,001$) en fonction du temps. Cependant aucune différence significative n'a été enregistrée entre écotype-essai. Au début du traitement, le PO a été de -0,9 MPa et -2,6 MPa en moyenne, respectivement pour les sites Guich et Benabid (Figure 22). A la fin des essais tous les écotypes ont vu leur PO chuter mais à des degrés différents. Néanmoins, la chute du PO dans le cas des écotypes stressés a été plus rapide et plus importante que celle de l'essai Guich. Le PO a ainsi atteint en moyenne et au terme de l'essai pour les plantes stressées -4,3 MPa contre -1,2 MPa pour les plantes témoins. Les écotypes i3 et i6 ont enregistré les PO les plus faibles au milieu et en fin de l'essai Guich, par contre, l'écotype o9 et Paradana ont maintenu leur PO pratiquement stable durant l'essai ne dépassant pas -1 MPa. En essai stressé (Benabid) et à la fin du

traitement, les valeurs élevées du PO ont été enregistrées par les écotypes sc1 et i6 (-3,1 MPa). Alors que les faibles PO ont été enregistrés par les écotypes i2, i10 et o16.

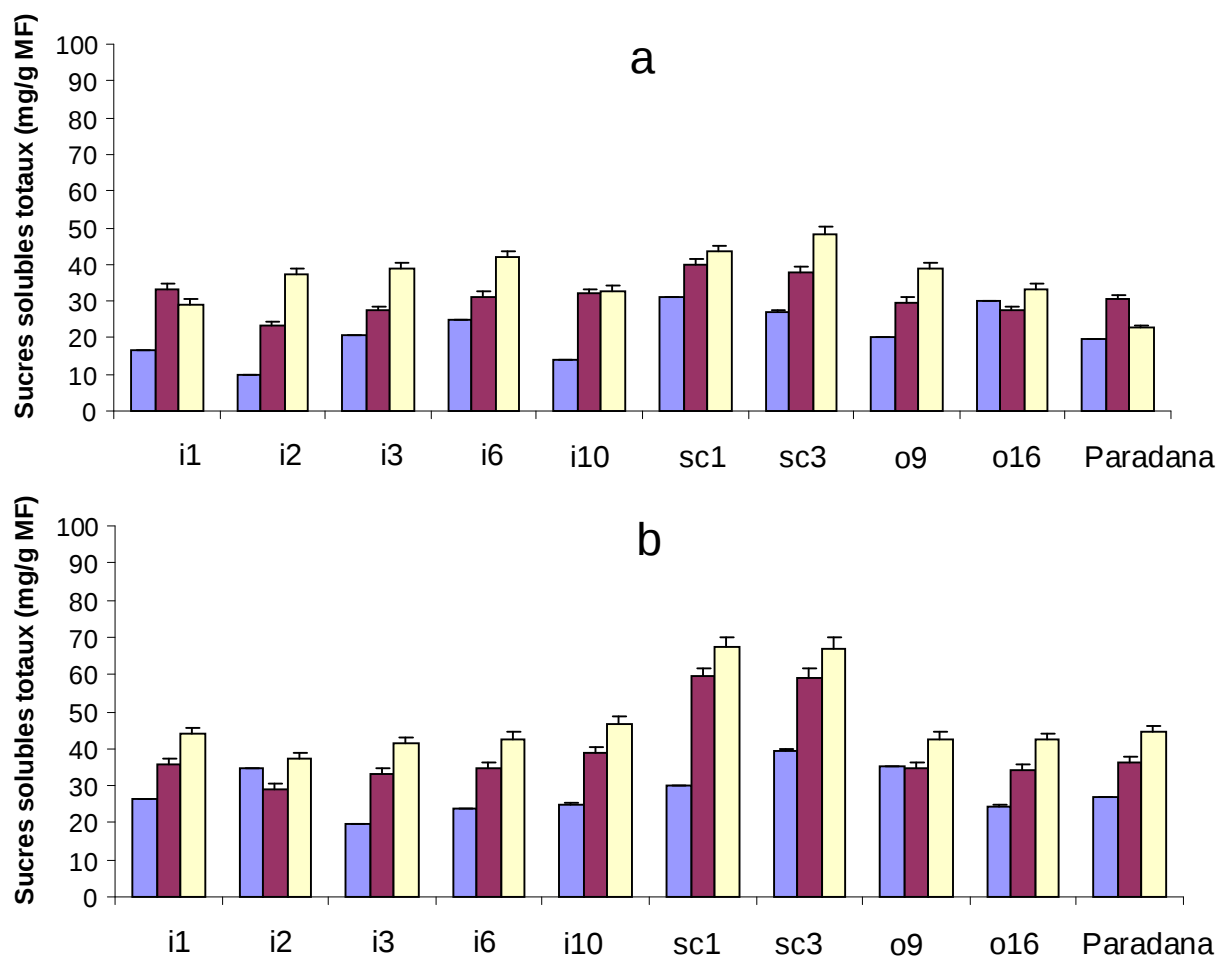


Figure 21. Evolution des teneurs en sucres solubles totaux des écotypes testés sur les sites Guich (Témoin) (a) et Benabid (Salin) (b). Après 4 semaines (T1), 8 semaines (T2) et 12 semaines (T3). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

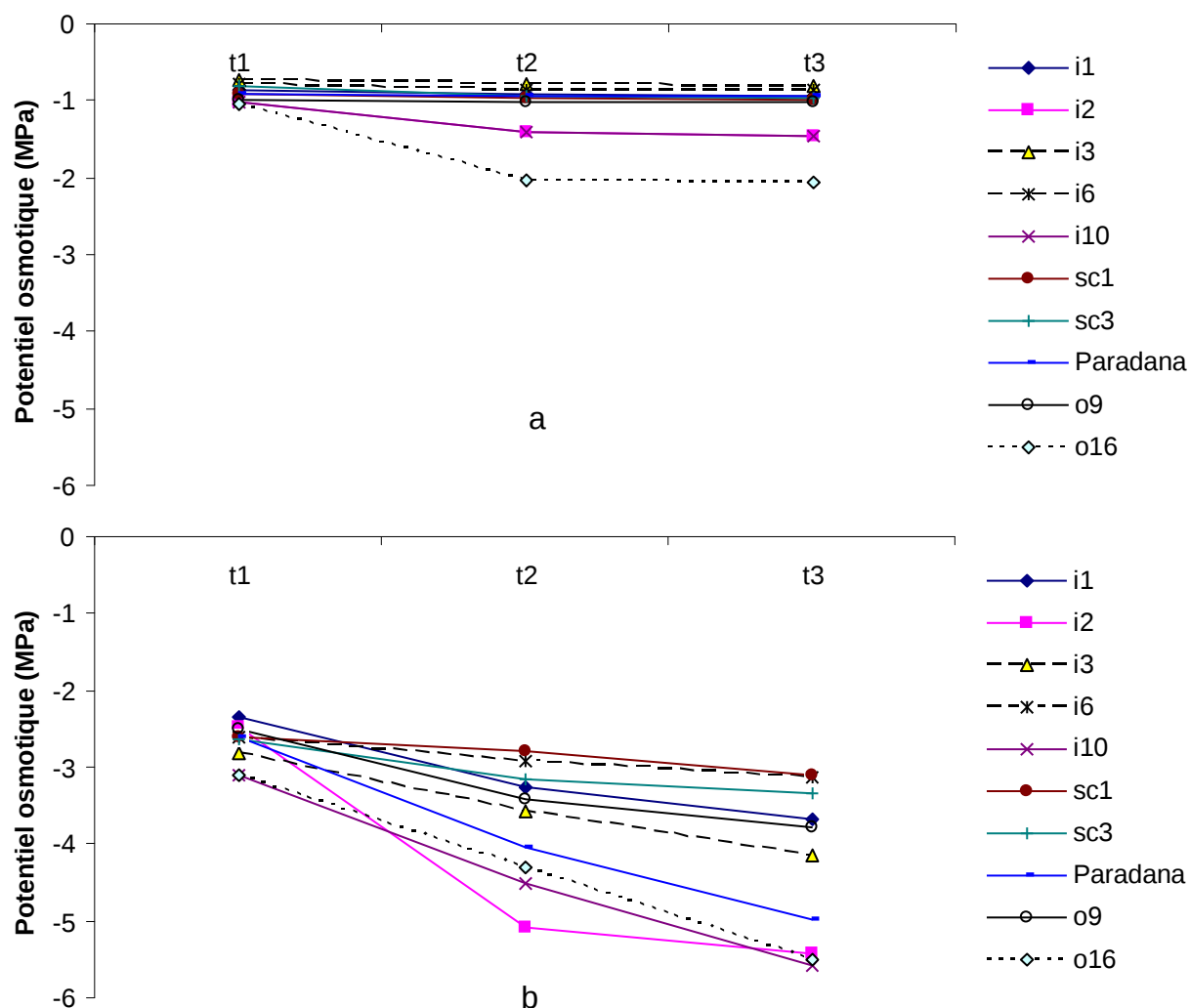


Figure 22. Evolution du potentiel osmotique des écotypes testés sur les sites Guich (Témoin) (a) et Benabid (Salin) (b). Après 4 semaines (T1), 8 semaines (T2) et 12 semaines (T3). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

3.6 Teneur en azote (TA)

La teneur en azote a montré une différence significative entre les écotypes ($p < 0,05$) mais non pas de l'interaction écototype-essai ($P > 0,05$). Sur le site Benabid *L. ornithopodioides* a exhibé pour les deux écotypes o9 et o16 une diminution de 20% et 41% successivement par rapport au site Guich (Figure 23).

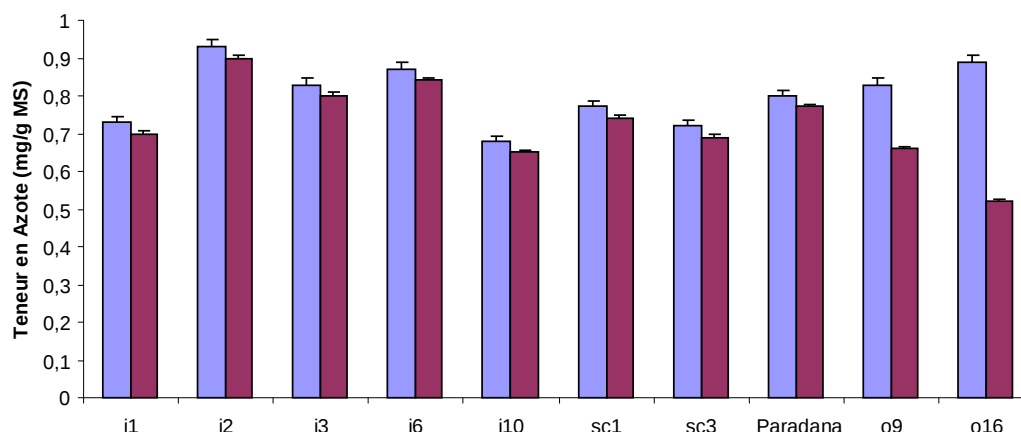


Figure 23. Evolution des teneurs en azote des écotypes testés sur les sites Guich (Témoin) (■) et Benabid (Salin) (■). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions $\pm$ l'écart type

3.7 Production de graines (PG) et capacité de germination (TG)

Les paramètres qui interviennent dans la capacité de la plante à se reproduire sont la production de semences par plante et le pouvoir germinatif. Ainsi, la croissance et le développement des plantes ont été suivis jusqu'à la production de graines. Le tableau 21 donne la production de graines par plante issues des sites Guich et Benabid, le poids de mille graines (PMG), ainsi que leur capacité germinative. La production de graines par plante n'a pas différencié statistiquement entre les deux sites de culture. Alors que l'interaction écotype-site d'essai a été significative ($p < 0,01$) pour la capacité germinative. Cette dernière a atteint 70% pour certains écotypes issus de Guich. Par contre elle a tombé à 10% pour les graines formées sur milieu Benabid (l'écotype i10) et même elle s'est annulée pour les écotypes sc1, sc3 et o16.

Tableau 21. Paramètres de production et capacité de germination des écotypes cultivées de trèfle et lotier et de la variété Paradana (Dans une colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne diffèrent pas au seuil de 5% selon le test LSD)

Ecotypes	Rendement en grains par plante (g)		PMG (g)		Capacité de germination sur eau distillée (%)	
	Site Guich	Site Benabid	Site Guich	Site Benabid	Site Guich	Site Benabid
i1	18,4b	16,1b	2,45a	2,03a	40c	26a
i2	17,2b	16,9b	2,14a	1,86a	60b	29a
i3	13,0c	13,0b	1,72b	1,05b	70a	30a
i6	24,5a	22,2a	1,84b	1,15b	56b	17b
i10	13,2c	13,0b	1,76b	0,70b	70a	10b
sc1	11,5d	9,2c	0,68d	0,35c	44c	0c
sc3	10,2d	10,0c	0,93c	0,62b	50b	0c
o9	21,4b	19,1a	0,42d	0,38c	58b	32a
o16	17,0b	14,7b	1,15c	0,59c	56b	0c
Paradana	15,6c	13,3b	1,56b	0,69b	50b	33a
L.S.D	0,4	0,78	0,01	0,03	1,02	1,6

3.8 Teneur en phytoestrogènes (TP)

Les analyses des profils UPLC des espèces étudiées avec la détection de PDA ont indiqué trois groupes distincts de composés polyphénoliques qui ont été identifiés sur la base de leurs spectres d'absorption (Figure 24). Le premier groupe a montré un spectre d'absorption avec le maximum d'absorption à 345 nm, identique au spectre du coumestrol. Le deuxième groupe a eu son maxima d'absorption à 214 nm caractéristique des flavonoïdes (la formononétine). Le troisième groupe a eu son spectre d'absorption à 254 nm, caractérisant les isoflavones (la daidzéine). Les trois groupes ont été quantifiés en utilisant des standards appropriés à l'aide de l'UPLC. La quantité totale a été calculée pour chaque pic à profil d'absorption similaire, et les quantités calculées sont résumées dans le Tableau 22.

On a déterminé une variation significative ($p \leq 0,01$) de la concentration des polyphénols testés (flavonoïdes, isoflavones et coumestanes) entre les écotypes pour les deux essais. Où, *T. scabrum* s'est caractérisée par des concentrations élevées d'isoflavones, allant de 69 à 85 mg/g MS en moyenne successivement sur essai Guich et Benabid. Les autres espèces ont montré soit des teneurs en isoflavones plus faibles, ou bien absence totale d'isoflavones (le cas de *T. isthmocarpum*). Cependant, les concentrations en isoflavones enregistrées pour l'essai Benabid ont été plus importantes que celles du Guich. Quant à la teneur en flavonoïdes, elle a varié de 2,5 à 12,8 mg/g MS pour l'essai Guich et 7,8 à 32,4 mg/g MS pour l'essai Benabid. *T. isthmocarpum* a montré des concentrations élevées en flavonoïdes par rapport aux autres espèces. D'autre part, la teneur en coumestanes a augmenté en passant du site Guich (milieu témoin) au site Benabid (milieu salin) et ce pour tous les écotypes (Tableau 22). Néanmoins, cette augmentation a été plus apparente chez les deux écotypes sc1 et sc3 avec une augmentation de 82% et 90% respectivement par rapport au témoin. Tandis que l'écotype i10 et Paradana ont enregistré une moindre augmentation de l'ordre de 30% et 55% respectivement par rapport à leur témoin. Les écotypes i2, i3 et i6 ne contiennent presque pas de coumestanes aussi bien pour le milieu témoin que salin.

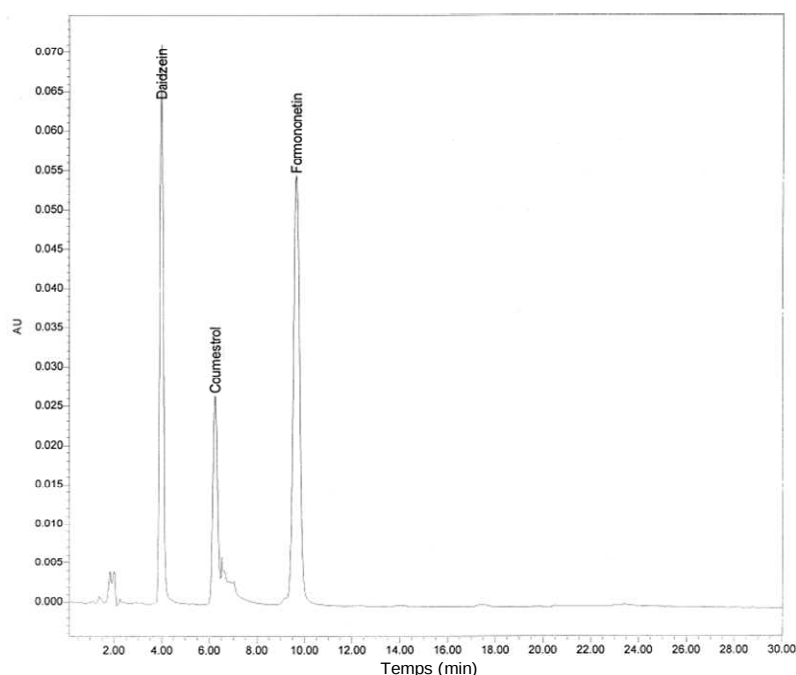


Figure 24. Spectres d'absorption caractérisant les groupes de composés phénoliques identifiés dans les espèces de *Trifolium* et *Lotus*

Tableau 22. Concentration des polyphénols (phytoestrogènes) ; les Flavonoïdes (Equivalent de formononétine), Isoflavones (Equivalent de daidzéine) et des coumestanes (équivalent de coumestrol) des écotypes testés sur les sites Guich (Témoin) et Benabid (Salin) ($\mu\text{g/g MS} \pm \text{écart-type}$). (Dans une colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne diffèrent pas au seuil de 5% selon le test LSD) ND : non détecté

Espèce	Ecotypes	Essai de Guich			Essai de Benabid		
		Flavonoïdes	Isoflavones	Coumestanes	Flavonoïdes	Isoflavones	Coumestanes
<i>T. isthmocarpum</i>	i1	4,00c $\pm$ 0,02	ND	0,7b $\pm$ 0,01	25,88b $\pm$ 0,28	ND	1,4d $\pm$ 0,01
	i2	6,68c $\pm$ 0,47	ND	ND	23,23a $\pm$ 0,39	ND	ND
	i3	2,50c $\pm$ 0,03	ND	ND	29,08b $\pm$ 0,21	ND	ND
	i6	8,31b $\pm$ 0,01	ND	ND	32,40a $\pm$ 0,68	ND	ND
	i10	4,76c $\pm$ 0,03	ND	0,6b $\pm$ 0,01	20,64b $\pm$ 0,20	ND	1,7d $\pm$ 0,2
<i>T. scabrum</i>	sc1	12,83a $\pm$ 0,12	66,45a $\pm$ 1,22	3,3b $\pm$ 0,1	15,74b $\pm$ 0,33	82,98a $\pm$ 0,38	19,01b $\pm$ 0,4
	sc3	7,67b $\pm$ 0,17	72,76a $\pm$ 0,43	12,5a $\pm$ 1,5	22,71a $\pm$ 0,02	88,38a $\pm$ 0,22	23,79a $\pm$ 1,61
<i>T. michelianum</i>	Paradana	1,42c $\pm$ 0,10	0,65d $\pm$ 0,01	5,6b $\pm$ 0,01	9,80c $\pm$ 0,02	5,53c $\pm$ 0,14	9,19c $\pm$ 0,01
<i>L. ornithopodioides</i>	o9	9,80b $\pm$ 0,02	8,58c $\pm$ 0,01	ND	10,30c $\pm$ 0,12	8,58c $\pm$ 0,01	10,30c $\pm$ 0,12
	o16	7,75b $\pm$ 0,03	18,70b $\pm$ 0,03	ND	7,87c $\pm$ 0,10	21,45b $\pm$ 0,2	ND

3.9 Analyses de corrélation entre les paramètres testés

Le tableau 23 résume les coefficients de corrélation entre les différents paramètres étudiés. Les corrélations détectées ont été entre la précocité de floraison et le rendement en matière sèche, avec un coefficient de l'ordre de 0,32 ; et entre la teneur en SST et le PO.

Tableau 23. Coefficients de corrélation entre les différents paramètres testés sur les sites Guich (Témoin) et Benabid (Salin). * coefficient de corrélation significatif à $P \leq 0,05$

	F	MS	SST	PO	TA	TG	PG	PMG	TP
F	1	0,32*	0,45	0,65	0,12	0,33	0,28	0,11	0,17
MS		1	0,22	0,78	0,84	0,25	0,65	0,43	0,14
SST			1	0,81*	0,35	0,44	0,75	0,21	0,51
PO				1	0,66	0,37	0,33	0,20	0,47
TA					1	0,17	0,51	0,79	0,25
TG						1	0,23	0,66	0,27
PG							1	0,35	0,36
PMG								1	0,18
TP									1

4. Discussion

La réduction la plus importante du rendement en MS sur le site Benabid par rapport au Guich a été marquée par les écotypes de *L. ornithopodioides*. Pourtant ce n'était pas le cas sous serre (Chapitre 3), où leur taux de réduction n'a pas dépassé 37% et ceci pour une concentration saline beaucoup plus importante de l'ordre de 220 mM NaCl. Par contre sur ce même site, les écotypes de *T. isthmocarpum* ont gardé leur supériorité qui a été déjà dévoilée sous serre (Chapitre 3). Ces écotypes ont montré des rendements similaires statistiquement à ceux enregistrés sur Guich et supérieurs à la variété Paradana. Sachant que *T. scabrum* à son tour a enregistré des rendements similaires statistiquement entre Guich et Benabid, toutefois sa biomasse et la plus faible par nature. Concernant la précocité de la floraison, *T. isthmocarpum* a enregistré une durée similaire statistiquement entre les deux sites d'étude et qualifiée de précoce. Tandis que *L. ornithopodioides* (o9 et o16) s'est avérée tardive sur Benabid par rapport à sa floraison sur Guich ainsi qu'aux autres écotypes. La corrélation positive (Tableau 23) entre la floraison et le rendement en MS ($r=0,32$) indique le lien entre ces deux paramètres. Ce retard de floraison peut être dû principalement à un allongement de la phase végétative en conditions de stress salin dû lui-même à une diminution de la vitesse de croissance végétative. Ceci peut se répercuter sur le rendement en MS expliquant ainsi le faible rendement enregistré par cette espèce sur site Benabid. En effet, la présence du sel dans le sol augmente la force que doit fournir la plante pour extraire l'eau. Ainsi les variétés

tolérantes essayent de réduire leur cycle afin de s'échapper à cette pression d'extraire l'eau. Les avantages de la précocité sont reliés à la présence de bonnes conditions de développement de la plante au début de son cycle et de ses composantes de rendement qui s'élaborent durant ces moments (Bamouh, 1998). Une étude de tolérance du blé au sel (Kobayashi *et al.*, 2005) indique un lien établi entre le temps de floraison et le degré de salinité appliquée. Elle rapporte l'existence d'allèles *Vrn* (exigence de vernalisation) et *Ppd* (exigence de photoperiodisme), et lorsque l'allèle dominant est présent la plante accumule moins de sodium. Ces allèles dominants confèrent également une floraison précoce.

L'interaction écotype-site d'essai a été non significative pour le PO, l'accumulation des SST et celle de l'azote. Ce qui signifie que l'irrigation saline n'a pas eu d'effet sur l'évolution de ces paramètres. Toutefois on a constaté que l'évolution du PO des écotypes testés a évolué significativement avec le temps et différemment selon les écotypes. Le potentiel osmotique chez i10 a atteint -5,75 MPa en fin de l'essai salin. Cet écotype peut survivre à un potentiel osmotique voisin à -6 MPa ce qui suggère que l'ajustement osmotique est très élevé chez cet écotype. Quant à l'accumulation des SST, a été plus importante chez les écotypes sc1 et sc3 de *T. scabrum*, un résultat similaire à celui trouvé sous serre (Chapitre 3), indiquant sa bonne osmorégulation. Ces composés semblent contribuer à la stabilité membranaire des tissus cellulaires et ainsi augmenter la tolérance à la salinité en assurant l'ajustement osmotique (Valentovič *et al.*, 2006).

La capacité germinative des graines récoltées au cours de l'expérience a manifesté une sensibilité à la salinité. Elle a été fortement dépendante ($p < 0,001$) des conditions du milieu de culture des plantes mères. L'aptitude des graines à germer sur l'eau distillée a diminué pour des graines issues des plantes cultivées en présence de NaCl. On a même noté une perte totale de viabilité se manifestant chez des graines récoltées sur certains écotypes sc1, sc3 et o16. Ben Ahmed *et al.* (2008) ont constaté un effet similaire sur la sétairie (*Setaria verticillata* L.) au fur et à mesure que la concentration en NaCl appliquée pendant la culture augmente. Quant au rendement en graines des écotypes testés, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les deux sites de culture.

D'autre part, l'interaction écotype-site d'essai a été significative ($p < 0,001$) pour la teneur en phytoestrogènes. L'irrigation saline au site Benabid a eu un effet sur l'accumulation des polyphénols, puisque leur concentration a été plus importante, particulièrement les isoflavones. Cependant les résultats intéressants de cette étude est l'absence totale d'isoflavones chez *T. isthmocarpum* et ceci pour les deux sites. Du même pour les coumestanes sauf les écotypes i1 et i10 avec une concentration négligeable sur le site Benabid

en moyenne de 1,55 mg/g DM. Par contre l'analyse des flavonoïdes a révélé leur présence chez tous les écotypes avec des teneurs faibles sur site Guich. Tandis qu'elle ont vu leur concentration s'élever sur site Benabid principalement chez *T. isthmocarpum*. D'autre part, les écotypes sc1 et sc3 de *T. scabrum* ont accumulé plus d'isoflavones avec en moyenne 85,68 mg/g DM. On note également que Paradana et *L. ornithopodioides* ont accumulé les moindres concentrations en flavonoïdes et de faibles teneurs en coumestanes. La différence d'accumulation entre les différents écotypes étudiés peut être liée à leur degré de tolérance à la salinité. En effet, plusieurs études ont rapporté chez un certain nombre de plantes un lien entre la tolérance à la salinité et l'augmentation des concentrations foliaires en polyphénols (Navarro *et al.*, 2006; Tattini *et al.*, 2006 ; Hajlaoui *et al.*, 2010). Ksouri *et al.*, 2007 ont révélé que l'accumulation de ces derniers est plus élevée chez le cultivar tolérant au sel par rapport à celui sensible. En outre, l'accumulation de divers composés polyphénoliques, en réponse à un stress environnemental a été démontré comme étant une conséquence de l'activité des isoformes spécifiques de phényl ammonialyase (Rohde *et al.*, 2004). Annicchiarico et Pagnotta (2012) ont trouvé des niveaux plus élevés de phytoestrogènes dans une végétation de *Trifolium pratense* L. consommée durant une année avec de faibles précipitations par rapport à deux autres années avec de fortes précipitations. Ainsi, l'accumulation élevée en isoflavones chez *T. scabrum* peut expliquer sa tolérance à la salinité. Vu qu'elle a montré des rendements en graines, en MS et une précocité à la floraison similaires statistiquement entre les deux sites à l'inverse de Paradana et *L. ornithopodioides*. Cependant toute augmentation de la teneur en polyphénols peut avoir un effet néfaste sur le bétail, étant des composés secondaires œstrogéniques. Des études antérieures de l'infertilité chez les animaux ont été attribués à des œstrogènes dans l'alimentation pastorale (Millington *et al.*, 1994). Ces œstrogènes et sous l'effet des facteurs de stress chez les végétaux, voient leur production accroître. A titre d'exemple, le stress thermique qui induit la production de phytoecdystéroïdes (Reixach *et al.*, 1997) et la sécheresse qui induit la production d'autres métabolites secondaires (Zhao *et al.*, 2005). A savoir les composés les plus recherchés sont la daidzéine et le coumestrol déjà mentionnés sur un certain nombre de trèfle comme le trèfle rouge, le trèfle souterrain et le trèfle blanc (Wong, 1992 ; Francis *et al.*, 1995). Adams (1995) a trouvé que le trèfle blanc peut produire le coumestrol, la daidzéine et la formononétine. Dans la présente étude, ce sont ces derniers composés qu'on a analysés leur présence. En effet, les recherches ont varié sur la dose à ne pas dépasser dans l'alimentation pastorale. A savoir que la luzerne contenant 25 ppm de formononétine diminue le taux d'ovulation chez les brebis (Smith *et al.*, 2000). En revanche les bovins nourris d'un ensilage contenant 37 ppm du

daïdzéine ont présenté des signes cliniques de la stimulation oestrogénique (Lookhart, 1990). Dans son étude de différents écotypes locaux de *Medicago* spp. Cremer-bach (1994) a mis en évidence que les écotypes dont la teneur en coumestrol est inférieure à 200 ppm de la MS ont été considérés comme étant inoffensifs. Ainsi on a admis dans la présente étude que la concentration à ne pas dépasser est 200 ppm pour le coumestrol, 25 ppm pour la formononétine et 30 ppm pour la daïdzéine. Nos résultats ont montré que la dose de coumestrol et de formononétine n'a pas dépassé la norme, au contraire leur concentration a été nulle pour certains écotypes particulièrement *T. isthmocarpum*. Tandis que la teneur en daïdzéine a dépassé la norme pour *T. scabrum*, ce qui peut limiter son utilisation comme espèce fourragère.

5. Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la supériorité des écotypes i1, i2, i3, i6 et i10 déjà détectée sous serre en la confirmant au champ, au contraire des écotypes de *L. ornithopodioides* qui n'ont pas manifesté les mêmes résultats de la serre. Ainsi les écotypes i1, i2, i3, i6 et i10 méritent d'être suivis de près pour une éventuelle utilisation par les agriculteurs. Certains auteurs ont rapporté que sous contrainte saline les caractères susceptibles d'améliorer la tolérance au sel sont la vigueur et la stabilité du rendement des plantes (Mainassara *et al.*, 2009). Dans notre cas on n'a pas pu examiner la stabilité du rendement car il faut plusieurs sites et années.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La présente étude a montré l'existence d'une certaine variabilité concernant les traits agronomiques, en particulier, la précocité et le rendement en matière sèche. Ces critères semblent être liés pour la plupart des espèces, aux conditions environnementales du site d'origine. Un résultat à prendre avec réserve vu le nombre restreint d'écotypes collectés pour certaines espèces. Les résultats montrent également que la distribution des espèces *Lotus* et *Trifolium* au Maroc varie en fonction de conditions pédologiques et climatiques.

Les variables écogéographiques les plus importantes regroupant les sites ont été les précipitations moyennes annuelles, l'altitude et la latitude. Parmi les espèces collectées par l'INRA, aucune n'a été trouvée sur tous les sites. Toutefois, *T. isthmocarpum*, *T. glomeratum* et *L. ornithopodioides* ont été les espèces les plus couramment rencontrées sur les sites de collecte. Il se peut que ces espèces dominent les autres. D'autres collections doivent être entreprises à différents moments de l'année, sur une large aire géographique et sur plusieurs années pour confirmer cette hypothèse.

Au terme de la première évaluation agronomique, une quarantaine d'écotypes a été sélectionnée. L'évaluation de l'effet de la salinité sur ces écotypes présélectionnés a été ensuite réalisée sur une gamme de concentrations de NaCl : 0 mM, 68 mM, 137 mM et 220 mM. La concentration en NaCl qui a permis une vraie discrimination entre les écotypes a été 137 mM. Cette dernière a provoqué 50% d'inhibition de la croissance pondérale des plantes. Sachant que 50% est le seuil utilisé pour le classement de la tolérance des plantes au sel. L'ensemble des paramètres abordés au cours de cette étude a montré une variabilité assez large des réponses à la salinité chez les espèces étudiées. Certaines comme *T. arvense*, *T. bocconeii*, *T. campestre*, *T. stellatum* et *T. tomentosum* ont été très sensibles à la salinité, même à faibles concentrations avec des taux de germination ne dépassant pas 40%. D'autres ont manifesté une réponse à la salinité qui diffère selon le stade végétatif. Il s'agit notamment des espèces *T. cherleri*, *T. scabrum* et *L. ornithopodioides*. L'espèce *T. cherleri* a été la plus tolérante pendant la phase de germination et à de fortes concentrations salines atteignant 220 mM de NaCl. Tandis que sa réponse à la salinité durant sa croissance a montré une accumulation importante de Na^+ dans ses tissus, réduisant sa conductance stomatique au CO_2 et, par conséquent, la photosynthèse, indépendamment du maintien de l'équilibre hydrique de la plante. Alors qu'on a noté l'inverse pour *T. scabrum* et *L. ornithopodioides*, où le taux de germination sur des fortes concentrations salines n'a pas dépassé 50%, contrairement aux stades ultérieurs où elles ont manifesté les réductions les plus faibles du rendement en MS

ainsi qu'un rapport K^+/Na^+ élevé. Toutefois le résultat le plus intéressant de cette étude est le maintien chez l'espèce *T. isthmocarpum* de sa tolérance à la salinité tout au long du cycle végétatif depuis la germination jusqu'à la floraison. Dépassant même celle de la variété commerciale Paradana, particulièrement sur les fortes concentrations. En examinant la teneur en ions Na^+ et Cl^- , *T. isthmocarpum* s'est avérée accumuler moins de Cl^- dans sa partie aérienne que les autres espèces testées sous les mêmes conditions salines. La tolérance de cette espèce à la salinité peut être liée à cette habilité à 'exclure' cet ion toxique.

Pendant la phase reproductive, le sel a affecté les composantes du rendement en grains et a induit une variabilité au niveau de la production du PMG selon les écotypes, aussi importante que celle notée pendant la phase de croissance végétative (réduction de croissance observée sur NaCl). Le suivi sous serre a permis de sélectionner les écotypes i1, i2, i3, i6, i10, sc1, sc3, o9 et o16 en se basant sur l'utilisation de caractéristiques agronomiques fiables et faciles à mesurer, notamment le rendement en MS et en graines sous irrigation saline par rapport à la non saline. Ces écotypes (à l'exception de sc1 et sc3) ont présenté des rendements similaires à la variété australienne Paradana sur la concentration 137 mM. En outre une supériorité a été manifestée sur la concentration 220 mM par les écotypes i1, i2, i3, i6, i10 par rapport à cette variété. Les écotypes ainsi sélectionnés ont servi de matériel génétique pour le suivi en plein champ, où le suivi jusqu'à la floraison a révélé que les écotypes tardifs sont moins productifs que les précoces. Ainsi, nos résultats montrent d'une manière générale que les écotypes précoces i2, i3, i10, i6 et i1 ont présenté des rendements moyens à élevés. Ils ont été qualifiés de tolérants par rapport aux autres écotypes. En effet la salinité cause la chute prématurée des feuilles, ce qui réduit la biomasse et par conséquent le rendement fourrager.

Par ailleurs, la précocité est aussi un caractère utile pour les plantes, surtout en conditions défavorables. Sous contrainte saline, les plantes appartenant à des écotypes tardifs meurent souvent avant la fin de leur cycle. En plus, même dans le cas des écotypes tolérants, lorsque ceux-ci sont tardifs, l'accumulation progressive du sel dans les organes se traduit par une altération de la floraison et une baisse de la production en grains. Néanmoins, il sera utile de procéder à des recherches supplémentaires sur les écotypes pré-sélectionnés, afin d'étudier leur réponse à des irrigations salines prolongées.

Cette étude appuie l'idée selon laquelle les polyphénols jouent significativement un rôle physiologique dans la tolérance à la salinité chez les espèces étudiées, en particulier les écotypes i1, i2, i3, i6, i10, sc1 et sc2. Chez ces écotypes, on a noté une forte accumulation de flavonoïdes.

En effet, la tolérance à la salinité est un phénomène à déterminisme génétique assez complexe, faisant intervenir entre autres des mécanismes physiologiques et biochimiques très variés. Il serait ainsi intéressant de poursuivre la recherche pour déterminer l'effet précis de ces composés polyphénoliques.

A la lumière de l'ensemble des résultats trouvés, le présent travail mérite d'être approfondi. D'abord d'un point de vue recherche appliquée, particulièrement pour les écotypes i1, i2, i3, i6 et i10, qui ont révélé leur supériorité et qui méritent d'être suivis de près pour une éventuelle utilisation par les agriculteurs, tout en évaluant au préalable leur appétibilité par les animaux. Ces écotypes ont montré une bonne tolérance au sel, aussi bien pendant la germination que durant la phase végétative, avec une bonne récupération de germination après culture sur milieu salin. On suggère également des tests d'hybridation de ces écotypes.

D'un point de vue recherche fondamentale, il serait intéressant de déterminer le (ou les) mécanisme(s) d'exclusion des ions Cl^- , détecté lors de cette étude, chez certains écotypes tolérants. Le recours à la biologie moléculaire pourrait contribuer à mener des recherches approfondies sur les gènes responsables de la tolérance à la salinité chez ces écotypes. Le but ultime serait de disposer de gènes d'intérêt pouvant être introduit chez d'autres légumineuses fourragères plus productives que *T. isthmocarpum* mais non tolérantes à la salinité.

Pour une meilleure exploitation, il est suggéré d'isoler des souches *Rhizobium* spécifiques et tolérantes et de tester leurs réponses physiologique et biochimique en association aux écotypes i1, i2, i3, i6 et i10 sélectionnés, afin de révéler une parfaite compatibilité plante hôte- *Rhizobium*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelguerfi A. et Laouar M. (1999) : Autoécologie et variabilité de quelques légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral : possibilités de valorisation en région méditerranéenne. *Pastagens e Forragens*. 20: 81-112.
- Abogadallah G. M. (2010). Sensitivity of *Trifolium alexandrinum* L. to salt stress is related to the lack of long-term stress-induced gene expression. *Plant Science*. 178: 491-500.
- Achheb A.E, Mudry J. et Mania J. (2001). First International Conference on Saltwater Intrusion and Coastal Aquifers-Monitoring, Modeling, and Management. Essaouira, Processus de salinisation des eaux souterraines dans le bassin Sahel-Doukkala (Maroc occidental). 13p.
- Adams N.R. (1995). Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science*. 73: 1509-1515.
- Aït Haddou M., Benyahia H., Benazzouz A. et Bousrhal A. 2004. Tolérance à la salinité de trois porte - greffes d'agrumes (*Citrange carrizo* et deux hybrides). *Cahiers Agricultures*. 13 : 277-81.
- Al-Karaki G.N. (2001). Germination, sodium, and potassium concentrations of barley seeds as influenced by salinity. *Journal of Plant Nutrition*. 24: 511-522.
- Al Sherif A. (2009). *Melilotus indicus* (L.) All., a salt-tolerant wild leguminous herb with high potential for use as a forage crop in salt-affected soils *Emad Flora*. 204: 737-746.
- Amaya I., Botella M.A., de la Calle M., Medina M.I., Heredia A. *et al.* (1999). Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Letters*. 457: 80-84.
- Annicchiarico P. et Pagnotta M. A. (2012). Agronomic value and adaptation across climatically contrasting environments of Italian red clover landraces and natural populations. *Grass and Forage Science*. 67 : 597-605.
- Antipolis S. (2003). Les menaces sur les sols dans les pays méditerranéens. *PNEU*. 2 : 44-45.
- Arcondeguy T., Huez I., Tillard P., Gangneux C., De Billy F., Gojon A., Truchet G. et Kahn D. (1997) The *Rhizobium meliloti* P_{II} protein, which controls bacterial nitrogen metabolism, affects alfalfa nodule development. *Genes Dev*. 11:1194-1206.
- Arambarri A.M. (2000). A cladistic analysis of the Old World species of *Lotus* L. (*Fabaceae: Loteae*). *Canadian Journal of Botany*. 78: 351-360.
- Asish K.P. et Anath B.D. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 324-349.
- Asres K., Gibbons S., Hana E. et Bucar F. (2005) Anti-inflammatory activity of extracts and a saponin isolated from *Melilotus elegans*. *Pharmazie*. 60 : 310 - 312.

- Ates E. et Tekeli A.S. (2007). Salinity tolerance of Persian Clover (*Trifolium resupinatum*. Var. *Majus Boiss.*) lines at germination and seedling stage. *World Journal of Agricultural Sciences*. 3: 71-79.
- Auda M.M.A. (2010). Contribution to the plant ecology and the most palatable species for grazing in the gaza strip mediterranean coast, Palestine. - *Asian Journal of Plant Sciences*. 9 (2): 88-93.
- Aydi S., Drevon J. J. et Abdelly C. (2004). Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiol Biochem*. 42: 833-840.
- Ayres J.F., Kelman W.M. et Blumenthal M.J. (2008). The Sharnae greater lotus (*Lotus uliginosus* Schkuhr) germplasm potential for low latitude environments. *Lotus Newsl*. 38: 7–19.
- Babagolzadeh A. (1998). Salinity tolerance in seven *Trifolium* species Université de soutenance. Thesis (Ph.D.) University of Liverpool.
- Ballard R.A., Craig A.D. et Charman N. (2002). Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil *Rhizobia*.2. Balansa clover (*Trifolium michelianum* Savi). 2002. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 42: 939 – 944.
- Bamouh A. (1998). Gestion de la contrainte pluviométrique pour l'amélioration de la production végétale et de l'efficacité d'utilisation de l'eau. *Bulletin National de Transfert de Technologie en Agriculture, IAV - Hassan II*. 50 : 3-8.
- Bannari A., Guedon A.M., EL-Harti A. et El-Ghmari A. (2008). Détection de la salinité et de la sodicité, faibles et modérées, en milieu agricole irrigué à l'aide du capteur ALI de EO-1 : Cas de la plaine de Tadlat au Maroc. *Les XIe Journées Scientifiques du Réseau Télédétection de l'Agence universitaire de la Francophonie*. 4 : 121-125.
- Bayliss K., Sivasithamparam K., Barbetti M. et Lagudah E. (2001). Variability of phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in leaves of subterranean clover is determined by their susceptibility to *Kabatiella caulivora* *Phytopathologia Mediterranea*. 40: 217–223.
- Barbetti M.J., You M.P., Li H., Ma X. et Sivasithamparam K. (2007). Management of root diseases of annual pasture legumes in Mediterranean ecosystems – a case study of subterranean clover root diseases in the south-west of Western Australia. *Phytopathologia Mediterranea*. 46: 239–258.
- Barbieri G., Vallone S., Orsini F., Paradiso R., De Pascale S., Negre-Zakharov F. et Maggio A. (2012). Stomatal density and metabolic determinants mediate salt stress adaptation and water use efficiency in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Plant Physiology*. 169: 1737-46.
- Barrientos L., Higuera M., Hernán A., Guerrero J., Ortega F. et Seguel I. (2002). Symbiotic effectiveness of indigenous strains of *Mesorhizobium loti* and *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) in three *lotus* plant species. *Agricultura Técnica*. 62: 212-225.

- Beale P.E., Bounejmate M., Lahlou A., Marr D.B. et Christiansen S. (1993) Distribution of annual *Trifolium* species in Morocco. Australian Journal of Agricultural Research. 44: 1303–1310.
- Begum F., Karmoker J.L., Fattah Q.A. et Moniruzzaman A.F.M. (1992). The effect of salinity on germination and its correlation with K^+ , Na^+ and Cl^- accumulation in germinating seeds of *Triticum aestivum* cv. Akbar. Plant and Cell Physiology. 33: 1009–1014.
- Ben Ahmed H.; Manaa A. et Zid E. (2008). Tolérance à la salinité d'une poaceae à cycle court: la sétairie (*Setaria verticillata* L.). Comptes rendus Biologies. 331 : 164-170.
- Ben Khaled L. (2003). Physiological and biochemical responses to salt stress of mycorrhized and/or nodulated clover seedlings (*Trifolium alexandrinum* L.). Agronomie. 23 : 571-580.
- Ben Naceur M., Rahmoune C., Sdiri H., Meddahi M. et Selmi M. (2001). Effet du stress salin sur la germination, la croissance et la production en grains de quelques variétés maghrébines de blé. Sècheresse. 12: 167-174.
- Bennani K., Thami Alami I. et Al Faiz C (2010). Évaluation morphologique et agronomique de soixante populations marocaines des genres *Trifolium* et *Lotus*. Fourrages 204 : 239-245.
- Bennett, S.J. (2000). Genetic variation of five species of *Trifolium* L. from south-west Turkey. Genetic Resources and Crop Evolution. 47: 81–91.
- Benvenuti S, Dinelli G, Bonetti A, Catizone P. 2005. Germination ecology, emergence and host detection in *Medicago lupulina*. Weed Research 45: 270– 278
- Benyahia H, Ait Haddou M, Jrifi M et Lamsettef Y. (2004). Effet de la salinité de l'eau d'irrigation sur la colonisation des racines des porte-greffes d'agrumes par *Phytophthora parasitica*. EDP Sciences. 59: 101-108.
- Ben Younes M et Gharbi A. (1997). Effet de la salinité sur la germination et le rendement de quelques espèces fourragères et céréalières. Revue de l'I.N.A.T. 2 : 2-4.
- Berger J.D., Robertson L.D. et Cocks P.S. (2002). Agricultural potential of Mediterranean grain and forage legumes: Key differences between and within *Vicia* species in terms of phenology, yield and agronomy give insight into plant adaptation to semi-arid environments. Genetic Resources and Crop Evolution. 49: 313-325.
- Birouk A. et Rejdali M. (2002). Conservation and Evaluation of Genetic Resources for Forage and Pasture in Morocco. Chapter 53. in SEED CONSERVATION Turning Science into Practice 945-954.
- Bobik C., Meilho E. et Batut J. (2006). FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. Journal of Bacteriology. 188: 4890-4902.
- Boschma S.P., Lodge G.M. et Harden S. (2008). Herbage mass and persistence of pasture legumes and grasses at two potentially different saline and waterlogged sites in northern New South Wales. Australian Journal of Agricultural Research. 48 : 553–567.

- Bounejmate M. (1995). Conservation et utilisation des espèces fourragères et pastorales autochtones du Maroc: acquis et perspectives. *Terre et Vie*. 14.
- Bounejmate M. (1997a). Trèfle de perse (*Trifolium resupinatum* L.). In Production et utilisation des cultures au Maroc (eds. G. Jaritz et M. Bounejmate). 178-181.
- Bounejmate M. (1997b). Bersim (*Trifolium alexandrinum* L.). In Production et utilisation des cultures au Maroc (eds. G. Jaritz et M. Bounejmate). 140-147.
- Brandli A., Simpson J.S. et Ventura S. (2010). Isoflavones isolated from red clover (*Trifolium pratense*) inhibit smooth muscle contraction of the isolated rat prostate gland. *Phytomedicine*; 17: 895-901.
- Brown H.E., Moot D.J., Lucas R.J. et Smith M. (2006). Sub clover, cocksfoot and lucerne combine to improve dry land stock production. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. 68: 109–115.
- Bulinska-Radomska Z. (2000). Morphological relationships among 15 species of *Trifolium* occurring in Poland. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 47: 267–272.
- Buyse J. et Merckx R. (1993). An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue *Journal of Experimental Botany*: 44 (10): 1627-1629.
- Chalck P. M. (1998). Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*. 49: 303-316.
- Cherkaoui H.D., Moussadek È. R. et Sahbi H. (2007). Apport des techniques géo-spatiales pour la caractérisation de la qualité des eaux sous-terraines des oasis de la vallée du draa- cas de la nappe de fezouata. *Options méditerranéennes*. 12 : 293-304.
- Çiçek N. et Çakırlar H. (2008). Effects of Salt Stress on Some Physiological and Photosynthetic Parameters at Three Different Temperatures in Six Soya Bean (*Glycine max* L. Merr.) Cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 194: 34–46.
- Claussen M., Luthen H., Blatt M. et Bottger M. (1997). Auxin induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta* 201: 227-234.
- Cordovilla M.P., Ocana A., Ligerio F. et Lluch C. (1995). Salinity effects on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes-*Rhizobium* symbiosis. *Journal of Plant Nutrition*. 18: 1595–1609.
- Cornea C., Voaideş M.C., Ciuca V., Gament E., Razec I. et Duşa M. (2011). Molecular methods for assessment the bacterial communities from different type of soils in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 39 (1):64-70.
- Couture I. (2004). Analyse d'eau pour fin d'irrigation. *Agri-Vision*. 8 p
- Craig A. D. et Beale P. E. (1995). Balansa clover; a new pasture species. *Proceedings, 3rd Australian Agronomy Conference*. 201. Hobart, Australia.

- Cremer-Bach M. (1992). Caractéristiques morphologiques et agronomiques de *Medicago* spp. annuelles autochtones au Maroc provenant de sites non alcalins. *Al Awamia*. 79: 35-50.
- Cremer-Bach M. (1994). Annual *Medicago* species on non alkaline soils in Morocco. *Angewandte Botanik* 68, 17-21.
- Cristaudo A., Gresta F., Avola G. et Miano V. (2010). Germination capability of immature seeds of *Lotus ornithopodioides* L. and *Scorpiurus subvillosus* L. In Sustainable Mediterranean grasslands and their multi-functions (eds. C. Porqueddu et M.M. Tavares de Sousa. Zaragoza, CIHEAM-IAMZ). 79: 289-292.
- Dadkhah A. R. (2010). Effect of Salt Stress on Growth and Essential Oil of *Matricaria chamomilla*. *Research Journal of Biological Sciences*. 10: 643-646.
- Dakak H., Benmohammadi A., Soudi B., Douaik A., Badraoui M. et Zouahri A. (2013). Mapping the Risk of Soil Salinization Using Electromagnetic Induction and Non-parametric Geostatistics. *Developments in Soil Salinity Assessment and Reclamation*, 155-166.
- Dear B.S., Sandral G.A., Peoples M.B., Wilson B.C.D., Taylor J.N. et Rodham C.A. (2003). Growth, seed set and nitrogen fixation of 28 annual legume species on 3 Vertosol soils in southern New South Wales. *Australian Journal of Agricultural Research*. 43: 1101-1115.
- Debbarh A. et Badraoui M. (2002). Irrigation et environnement au Maroc : situation actuelle et perspectives Actes de l'atelier du PCSI, Montpellier, France 14p.
- De Boer A. Volkov H.V. (2003). Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. *Plant, Cell and Environment*. 26: 87–101.
- Delgado O., Ballesteros E. et Vidal M. (1994) Seasonal variation in tissue nitrogen and phosphorus of *Cystoseira mediterranea* Sauvageau (Fuciales, *Phaeophyceae*) in the Northwestern Mediterranean Sea. *Botanica mar.* 37:1-7.
- Del Pozo A, Avendano J. et Ovalie C. (2000). Long term productivity of a ley farming system in the "secano interior" of central Chile. *Cahiers Options Méditerranéennes*. 39: 235-238.
- De Torresia J., Garzónb E., Ryanc J. et González-Andrésd F. (2012). Organic Cereal/Forage Legume Rotation in a Mediterranean Calcareous Soil: Implications for Soil Parameters.12: 215-230.
- Dhingra H.R., Varghese T.M. (1993). Effect of salinity on flowering and male reproductive functions of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Biologia Plantarum*. 35: 447–452.
- Díaz P., Borsani O. et Monza J. (2005a). *Lotus* related species and their agronomic importance. In *Lotus japonicus* (eds. A.J. Márquez). The Netherlands. 25–37.
- Díaz P.; Borsani O., Márquez A. et Monza J. (2005b) Osmotically Induced Proline Accumulation in *Lotus corniculatus* Leaves is Affected by Light and Nitrogen Source. *Plant Growth Regulation*. 46: 223 - 232.
- Diego H., Sanchez J., Cuevas C., Chiesa M. A. et Oscar A. R. (2005). Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Science*. 168:541–546.

- Duru M. et A. Langlet. (1996). Effets de la compétition pour la lumière et du déficit en eau sur l'évolution du rapport feuille/tige de la luzerne. Fourrages 134 : 199-204.
- Ehrman T. et Cocks P.S. (1994). Reproductive strategies in annual legume species on an aridity gradient. Journal of Applied Ecology. 27 : 578-591
- Ellison N.W., Liston A., Steiner J.J., Williams W.M. et Taylor N.L. (2006). Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium-Leguminosae*). Molecular Phylogenetics and Evolution. 39: 688–705.
- Emile J. C. et Traineau R. (1991). Valeur alimentaire comparée de cultures pures et d'associations graminée-grande légumineuse. Fourrages. 126: 239-253.
- Estrella M.J., Muñoz S., Soto M.J., Ruiz O. et Sanjuán J. (2009). Genetic Diversity and Host Range of *Rhizobia* Nodulating *Lotus tenuis* in Typical Soils of the Salado River Basin – Argentina. Applied and Environmental Microbiology. 75: 1088–1098.
- Ewert M.S, Outlaw W.H., Zhang S., Aghorham K. et Riddle A. (2000). Accumulation of an apoplastic solute in the guard-cell wall is sufficient to exert a significant effect on transpiration in *Vicia faba* leaflets. Plant, Cell and Environment. 23: 195-203.
- Ewing M. (1999). Annual pasture legumes: a vital component stabilizing and rehabilitating low-rainfall Mediterranean ecosystems. Arid Soil Research and Rehabilitation. 13: 327-42.
- FAO (1996). The state of the world of plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, Italy.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D. et Basra S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development. 29: 185–212.
- Fennane M. et Ibn Tattou M. (1998). Catalogue des plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du Maroc. Bocconeia. 8 : 1-243.
- Fennane M., Ibn Tattou M., Ouyahya A. et El Oualidi J. (2007). Flore pratique du Maroc : Manuel de détermination des plantes vasculaires. Vol. 2, *Angiospermae (Leguminosae-Lentibulariaceae)*. Rabat: Institut Scientifique, Université Mohammed V : 636 p.
- Flowers T.J. et Hajibagheri M. (2001). Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. Plant and Soil. 231: 1–9.
- Flowers T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany. 55:307–319.
- Flowers T.J. et Colmer T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes New Phytologist. 179 : 945–963.
- Foolad M.R. et Ashraf M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59:206–216.

- Gaddes N.E., Abdelguerfi A., Laouar M., Tazi M. et Bounejmate M. (2000). Présent et futur des pâturages et des légumineuses fourragères en région méditerranéenne: cas du Nord de l'Afrique et de l'Ouest de l'Asie *In: Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses; Proceedings of the 10th Meeting of the Mediterranean Sub-Network of the FAO-CIHEAM Inter-Regional Cooperative Research and Development Network on Pastures and Fodder Crops. Cahiers Options Méditerranéennes. Sulas L. (ed.). Plant Production and Protection. 45 : 461-467*
- Gage D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68: 280-300.*
- Gallardo-Carrera A. (2006). Analyse et modélisation de la levée sous croûte. Contribution à l'amélioration du modèle SIMPLE. Doctorat Agronomie, INRA - Unité d'agronomie Laon-Reims-Mons, Paristech. 86 p.
- Gardès A., Bonnefont D., Zohreh A. et Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? Mécanismes biochimiques 91-96
- Genin D. (1990). Composition chimique des plantes ingérées et régime saisonnier de caprins sur un parcours aride. *Fourrages. 124 : 385-397.*
- Giraud E. (2007). Symbiose rhizobium/légumineuse : un nouveau sésame. *Medecine/Sciences; 23 : 6-7.*
- Girma F.S. et Krieg D.R. (1992). Osmotic adjustment in *Sorghum*. *Mechanisms of diurnal osmotic potential changes. Plant Physiology. 99: 577-582.*
- Glenn E.P., Olsen M., Moore D., Miyamoto S. (1994). How much sodium accumulation is necessary for salt tolerance in subspecies of the halophyte *Atriplex canescens*? *Plant, Cell and Environment. 17: 711-719.*
- Greenland D.J. (1991). Changes in the nitrogen status and physical conditions of soils under pastures, with special reference to the maintenance of the fertility of the Australian soils used for growing wheat. *Soils and Fertilizers. 34 : 237-251.*
- Hajlaoui H., Denden M. et Bouslama M. (2006). Effet du chlorure de sodium sur les critères morpho-physiologiques et productifs du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). *Annales de l'INRGREF 8 : 171-187.*
- Hajlaoui H., M. Denden et Bouslama M. (2007). Etude de la variabilité intraspécifique de tolérance au stress salin du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) au stade germination. *Tropicultura. 25 : 168-173.*
- Hajlaoui H., El Ayeb N., Garrec J.P. et Denden M. (2010). Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. *Industrial Crops and Products. 31:122-130.*
- Hamilton R.S., Hughes S.J. et Maxted N. (2001). Ex Situ conservation of forage legumes. In the genetic diversity of legumes species in the mediterranean, Maxted and Bennett. *Kluwer Academic Press. 263-291.*

- Hanslin H.M., Eggen T. (2005). Salinity tolerance during germination of seashore halophytes and salt-tolerant grass cultivars. *Seed Science Research*. 15: 43-50.
- Hassani A., Dellal A., Belkhodja M. et Kaid-Harche M. (2008). Effet de la salinité sur l'eau et certains osmolytes chez l'orge (*Hordeum vulgare*). *European Journal of Scientific Research*. 23: 61-69.
- Haris P.J.C. et Ashraf M. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 166: 3-16.
- Henzler T., Waterhouse R.N., Smyth A.J., Carvajal M., Cooke D.T., Schäffner A.R., Steudle E. *et al.* (2000). Diurnal variation in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus japonicus*. *Planta*. 210: 50-60.
- Heller D. et Zohary M. (1984). The genus *Trifolium* L. *Academy of Sciences and Humanities*. 200 p.
- Hsissou Y., Bouchaou M., Krimissa J. et Mudry A. (2001). Caractérisation de l'origine de la salinité des eaux de la nappe côtière d'Agadir (Maroc). *First International Conference on Salt water Intrusion and Coastal Aquifers-Monitoring, Modeling, and Management*. Essaouira. 10 p.
- Hubac C. et Guerrier D. (1992). Etude de la composition en acides aminés de deux *Carex*: le *Carex stenophylla*, très résistant à la sécheresse, et le *Carex setifolia*, peu résistant. Effet d'un apport de proline exogène. *Oecol Plant*. 7: 147-165.
- Inoue Y., Morinaga S. et Shibayama M. (1993). Non-destructive estimation of water status of intact crop leaves based on spectral reflectance measurements. *Japan Journal of Crop Science*. 62: 462- 469.
- Isla R. et Aragüés R. (2009). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to diurnal and nocturnal saline sprinkler irrigations. II: shoot ion content and yield relationships (Citations: 2) *Journal: Irrigation Science - IRRIG SCI*. 27: 507-513.
- Issolah R. et Abdelguerfi A. (2000) Study of the variability in 28 spontaneous populations of *Trifolium tomentosum* L.: relations with factors of the environment of origin. Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses. *Cahiers Options Méditerranéennes*. 45: 29-32.
- Issolah R. et Abdelguerfi A. (2004). Variabilité morphologique chez plusieurs trèfles spontanés en Algérie. Actes de la 11^{ème} réunion du Sous Réseau Ressources fourragères Méditerranéennes du réseau coopératif interrégional FAO-CIHEAM de Recherche et Développement sur les pâturages et les cultures fourragères. Djerba (Tunisie). *Cahiers Options Méditerranéennes*. 62: 81-84.
- James R.A., Rivelli A.R., Munns R. et Von Caemmerer S. (2002). Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt- stressed durum wheat. *Functional Plant Biology* 29 : 1393-1403.

- Janczarek M., Kutkows J., Piersia T. et Skorups A. (2010). *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* rosR is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BioMed Central Microbiology*. 10:284. 1-23
- Jaritz G. (1990). Études agro écologiques des prairies à *Medicago* spp. annuelles et de jachères pâturées de l'UREO Had Soualem. *Al Awamia*. 74 : 19-32.
- Jaritz G. (1992). Synthèse de sept années d'expérimentation pastorale et fourragère à Zouada près de Larache. *Al Awamia*. 79 : 75-124.
- Jaritz G. (1997). Trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum* L.). In Production et utilisation des cultures au Maroc (eds. G. Jaritz et M. Bounejmate). 169-177.
- Julier B. et Huyghe C. (2010). Quelles légumineuses fourragères (espèces et variétés) et quelles conduites pour améliorer l'autonomie protéique des élevages herbivores? *Innovations Agronomiques*. 11: 101-114.
- Jung J.H. et Park C.M. (2011). Auxin modulation of salt stress signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Signaling and Behavior* 6:8, 1198-1200.
- Jürgen D., Janišová M., Rüşü S. et Vrahnakis M. (2010). Bulletin of the European Dry Grassland Group. *European Dry Grassland Group*, 6. 28p
- Kalberer S. R., Wisniewski M. et Arora R. (2006). Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: Current understanding and emerging concepts. *Plant Science* 171: 3–16.
- Karrou M. (1998). Observations on effect of seeding pattern on water-use efficiency of durum wheat in semi-arid areas of Morocco. *Field Crops Research*. 59 : 175-179.
Chapter 18
- Kenneth A S, Larry D R et Maxted N. (2001). Utilisation of forage and pasture legume diversity, plant genetic resources of legumes in the Mediterranean. In N. Maxted et al. (eds.). *Sciences business media Dordrecht*. 327-328.
- Khalid M.N., Iqbal H.F., Tahir A. et Ahmad A.N. (2001). Germination potential of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) under saline conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4: 395-396.
- Khan M.A. et Ungar I.A. (2001). Effect of germination promoting compounds on the release of primary and salt-enforced seed dormancy in the halophyte *Sporobolus arabicus* Boiss. *Seed science and technology*. 19: 299-306.
- Khemiri H., Belguith H., Jridi T., Ben El Arbi M. et Ben Hamida J. (2004). Caractérisation biochimique d'une amylase active au cours du processus germinatif des graines de colza (*Brassica napus* L.). *Enzymologie et métabolisme. Congrès International de Biochimie*. 146-149.
- Kobayashi F., Takumi S., Kume S., Ishibashi M., Ohno R., Murai K. et Chiharu N. (2005). Regulation by Vrn-1/Fr-1 chromosomal intervals of CBF-mediated Cor/Lea gene expression and freezing tolerance in common wheat. *Journal of Experimental Botany* 56: 887-895.

- Kong X.Q., Gao X.H., Wei S., Jing A., Zhao Y.X. et Zhang H. (2011). Cloning and functional characterization of a cation–chloride cotransporter gene OsCCC1. *Plant Molecular Biology*, 75: 567-578.
- Kramina T. E. (1999). A contribution to the taxonomic revision of the *Lotus corniculatus* complex (*Leguminosae, Loteae*) in the European part of the former USSR. *Systematics and Geography of Plants*. 68: 265–279.
- Ksouri R., Falleh H. et Abdelly C. (2007). Activité antioxydante et contenu en polyphénols dans les différents organes de l'artichaut sauvage *Cynara cardunculus*. *Revue des Régions Arides*. 341-344.
- Kulaeva O.N. et Prokoptseva O.S. (2004). Recent Advances in the Study of Mechanisms of Action of Phytohormones *Biochemistry*. 69: 233-247.
- Kumar D., Deepika Teotia S. R. et Singh J. B. (2010). Performance of different berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) cultivars for germination and seedling growth attributes under salinity stress. *Progressive Agriculture*. 10 : 147-150.
- Kyaw K.M., Toyota K., Okazaki M., Motobayashi T. et Tanaka H. (2005). Nitrogen balance in a paddy field planted with whole crop rice (*Oryza sativa*) during two rice-growing seasons. *Biology and Fertility of Soils*. 42: 72-82.
- Lahlou M., Badraoui M., Brahim S., Goumari A. et Tessier D. (2002). Modélisation de l'impact de l'irrigation sur le devenir salin et sodique des sols. Actes de l'atelier du PCSI, Montpellier, France. 28-29.
- Lazrek F. (2008). Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de Doctorat Es-Sciences. Université Mohammed V, Rabat, 254p.
- Levent T.A, Kay C., Dikilitas M. et Higgs D. (2008). The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany*. 62: 1-9.
- Lloyd D.L., Smith K.P., Clarkson N.M., Weston E.J. et Johnson B. (1991). Sustaining multiple production systems. Ley pastures in the subtropics. *Tropical grassland*. 25: 181–188.
- Lopez M., Herrera-Cervera J.A., Iribarne C., Tejera N.A. et Lluch C. (2008). Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: Nodule carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology*. 165: 641-650.
- Loss S.P. et Siddique K.H.M. (1994). Morphological and physiological traits associated with wheat yield increases in Mediterranean environments. *Advances in Agronomy*. 52: 229-276.
- Luo Q., Bingjun Y. et Liu Y. (2005). Differential selectivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. *Journal of Plant Physiology*. 162: 1003–1012.

- Lutts S., Kinet J.M. et Bouharmont J. (1999). Effect of various salt and mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures. *Journal of Plant Physiology*. 148:86–95.
- Maathuis F.J.M. et Amtmann A. (1999). K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular K^+/Na^+ ratios. *Annals of Botany*. 84: 123–133.
- Mainassara Z., Bouaziz S., Boulbaba L., Taief A. et El Aouni M. (2009). Paramètres agronomiques liés à la tolérance au sel chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). Notes de la rédaction. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*. 13 : 113-119.
- Malaviya D.R., Roy A.K., Kaushal P., Kumar B. et Tiwari A. (2008). Phylogenetic studies based on isozyme similarity among *Trifolium* species. *Plant Systematics and Evolution*. 276 : 125–136.
- Marañón, T. 1998. Soil seed bank and community dynamics in an annual-dominated Mediterranean salt-marsh *Journal of Vegetation Science* 9: 371-378.
- Marañón T., Romero J.M. et Murillo J.M. (1989). Salt tolerant legumes from the Guadalquivir delta (S.W. Spain). XVI International Grassland Congress. Nice, France, 1503–1504.
- Martir M.C., Tlustý B., van Berkum P. et Graham P.H. (2007). The genetic diversity of *rhizobia* associated with *Dalea purpurea* Vent. in fragmented grasslands of west-central. Minnesota *Canadian Journal of Microbiology*. 53: 351–363.
- Masters D.G., Benes S.E. et Norman H.C. (2007). Biosaline agriculture for forage and livestock production. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 119. 234–248.
- Matthaus D. (1990). Sélection d'écotypes locaux de trèfle souterrain. *Al Awamia*. 74: 33-42.
- McAllister T.A., Martinez T., Dong Bae H., Alister D.M., Yanke L.J. et Graham A.J. (2005). Characterization of Condensed Tannins Purified From Legume Forages: Chromophore production, protein precipitation, and inhibitory effects on cellulose digestion. *Journal of Chemical Ecology*. 31: 2049-2068.
- McIntyre G. 1997. The role of nitrate in the osmotic and nutritional control of plant development. *Australian Journal of Agricultural Research*. 24: 103–118.
- Mer R.K., Prajith P.K., Pandya D.H., Pandey A.N. (2000). Effect of salts on germination of seeds and growth of young plants of *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Cicer arietinum* and *Brassica juncea*. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 185 : pages 209–217.
- Mezni' M., Bizid E. et Harnza M. (1999). Effets de la salinité des eaux d'irrigation sur la survie et la croissance de trois cultivars de luzerne pérenne. *Fourrages*. 158 : 169-178.
- M'Hirit O. et Maghnouj M. (1997). Stratégie de conservation des ressources génétiques forestières au Maroc. In *Ressources phytogénétiques et développement durable* (eds. A. Birouk et M. Rejdali), Actes Editions, Rabat, Maroc. 123-138.

- Miguel A.Q. et Victoriano V. (1999). Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Letters*, 457, 80-84.
- Misra N. et Dwivedi U.N. (2004). Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. *Plant Science*. 166: 1135–1142.
- Morant-Manceau A, Pradier E, Tremblin G (2004). Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and Gas Exchange of a hexaploid triticale and Its Parental Species Under salt stress. *Journal of Plant Physiology*. 161: 25-33.
- Munns R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment*. 16 : 15–24.
- Munns R., Schachtman D.P. et Condon A.G. (1995). The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22: 561-569.
- Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25: 239-250.
- Mwale S.S., Hamusimbi C. et Mwansa K. (2003). Germination, emergence and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to osmotic seed priming. *Seed Science and Technology*. 31: 199–206.
- Naczek M. et Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A*. 1054: 95-111.
- Navarro J.M., Flores P., Garrido C. et Martinez V. (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*. 96: 66-73.
- Nichols P.G.H., Manus S., Al Imran M., Timothy D.C. (2001). Salt tolerance in germinating seedlings of annual pasture legumes. 2nd International Salinity Forum Salinity, water and society - global issues. Local action 1-4.
- Nichols P.G.H., Loi A., Nutt B.J., Evans P.M., Craig A.D., Pengelly B.C. and 20 others. (2007). New annual and short-lived perennial pasture legumes for Australian agriculture - 15 years of revolution. *Field Crops Research*. 104: 10-23.
- Nichols P., Loi A., Nutt B., Snowball R. et Revell C. (2010a). Domestication of New Mediterranean Annual Pasture Legumes. In *Sustainable use of genetic diversity in forage and turf breeding* (eds. C. Huyghe). 137-141.
- Nichols P., Craig A., Bonython A., Rogers M.J., Ballard R., Charman N., Hughes S., Colmer T., McClements D. et Barrett-Lennard E. (2010b). Development of *Melilotus siculus*, a new salt and waterlogging-tolerant annual fodder legume species for mediterranean-type climates. *Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding*, 131-135.
- Norman H.C., Ewing M.A., Loi A., Nutt B.J. et Sandral G.A. (2000). The pasture and forage industry in the mediterranean bioclimates of Australia. *Cahiers Options méditerranéennes*. 45: 469-476.

- Norman H.C., Masters D.G., Rintoul A.J., Wilmot M.G., Jayasena V., Loi A. et Revell C.K. (2005). The relative feeding value of a new pasture legumes, compared with subterranean clover (*Trifolium subterraneum*). Australian Journal of Agricultural Research. 56: 637-644.
- Ober E.S., Mich Le Bloa C.J.A., Clark A., Royal K.W., Jaggard et Pidgeon J.D.. (2005). Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugarbeet. Field Crops Research. 91: 231-249.
- Oleszek W. et Stochmal A. (2002). Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. Phytochemistry. 61: 165–170.
- Ortega C.O., Ochoa-Alfaro A.E., Reyes-Agüero J.A., Aguado-Santacruz G.A. et Jiménez-Bremont J.F. (2008). Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. Plant Physiology and Biochemistry. 46: 82-92.
- Osborne J.M., Fox J.E.D. et Mercer S. (1993). Germination response under elevated salinities of six semi-arid blue bush species (Western Australia). In: towards the rational use of high salinity plants (Eds. H. Lieth et A. Al Masoom). 1, 323-338. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 521 p.
- Owens V.N., Albrecht K.A., Muck R.E. et Duke S.H. (2000). Protein Degradation and Fermentation Characteristics of Red Clover and *Alfalfa* Silage Harvested with Varying Levels of Total Nonstructural Carbohydrates. 39: 1873-1880.
- Ozlem O. A. (2011). Salt tolerance in red clover (*Trifolium pratense* L.) seedlings. African Journal of Biotechnology. 10: 8774-8781.
- Pantoja O., Dainty J. et Blumwald E. (1989). Ion channels in vacuoles from halophytes and glycophytes. FEBS Letters. 255: 92–96.
- Papadopoulos Y. et Kelman W. (1999). Traditional breeding of Lotus species. In: Trefoil: The science and technology of *Lotus* (Ed. P. Beuslink). American Society of Agronomy, Madison, WI. 187–198.
- Pederson G.A., Quesenberry K.H., Smith G.R. et Guteva Y.K. (1999). Collection of *Trifolium* sp. and other forage legumes in Bulgaria. Genetic Resources and Crop Evolution. 46: 325–330.
- Pengelly B.C., Hall E., Auricht G., Bennell M. et Cook B.G. (2006). Identifying potential pasture species for grazing systems in the Mallee-Wimmera. CSIRO Sustainable Ecosystems, Canberra. 109p
- Porqueddu C. et González F. (2006). Role and potential of annual pasture legumes in mediterranean farming systems C. PASTOS, XXXVI. 2: 125–142.
- Predeepa R. J. et Ravindran D. A. (2010). Nodule formation, distribution and symbiotic efficacy of *Vigna unguiculata* L. under different soil salinity regimes. Journal of Food and Agriculture. 22 : 275-284.

- Rascio A. S., Cedola G., Pastore M.C. et Wittner D.G. (1992). Osmotic and elastic adjustment of durum wheat leaves under stress conditions. *Genetic Agriculture*. 41: 427-436.
- Reeve W., O'Hara G., Chain P, Ardley J. *et al.* (2010). Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. *Standards in Genomic Sciences*. 28 :66-76.
- Reixach N., Lafont R., Camps F. et Casas J. (1999). Biotransformation of putative phytoecdysteroid biosynthetic precursors in tissue cultures of *Polypodium vulgare*. *European Journal of Biochemistry*. 266: 608-615.
- Rejili M., Vadel A.M., Guetet A., Mahdhi M., Lachiheb B., Ferchichi A. et Mars M. (2009). Influence of temperature and salinity on the germination of *Lotus creticus* (L.) from the arid land of Tunisia. *African Journal of Ecology*. 48: 329-337
- Riccardi F., Gazeau P., Jacquemot M.P., Vincent D. et Zivy M. (2004). Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 1003-11.
- Ridolfi M., Jean Pierre Garrec, Philippe Louguet et Daniel Lafray. (1994). Effects of potassium and calcium deficiencies on stomatal functioning in intact leaves of *Vicia faba*. *Canadian journal of botany*. 72: 1835-1842.
- Robledo M., Inez-Zurdo J. Velazquez E. *et al.* (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105: 7064 –7069.
- Rochdi A., Lemsellek J., Bousarhal A. et Rachidai A. (2005). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 9: 65–73.
- Rochon J.J., Doyle C.J., Greef J.M., A. Hopkins, Molle G., Sitzia M., Scholefield D. et Smith C.J. (2004). Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects Blackwell Publishing Ltd. *Grass and Forage Science*. 59: 197–21.
- Rogers M.E. et Noble C.L. (1991). The effect of NaCl on the establishment and growth of balansa clover (*Trifolium michelianum* Savi var. *balansae* Boiss.) *Australian Journal of Agricultural Research*. 42: 847-857.
- Rogers M.E., Noble C.L., Halloran G.M. et Nicolas M.E. (1995). The effect of NaCl on the germination and early seedling growth of white clover (*Trifolium repens* L.) populations selected for high and low salinity tolerance *Seed science and technology*. 23: 277-287.
- Rogers M.E., Noble C.L., Halloran G.M. et Nicolas M.E. (1997a). Selecting for salt tolerance in white clover (*Trifolium repens*): chloride ion exclusion and its heritability. *New Phytologist* 135: 645–654.
- Rogers M.E., Noble C.L. et Pederick R.J. (1997b). Identifying suitable temperate forage legume species for saline areas. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 37: 639-645.

- Rogers M.J., Colmer T.D., Frost K., Henry D. *et al.* (2006). The influence of salinity and waterlogging on growth, nutritive value and ion relations in *Trifolium* species. 2nd International Salinity Forum Salinity, water and society - global issues. Local action 1-4.
- Rogers M.E., Colmer T.D., Frost K., Henry D., Cornwall D., Hulm E., Deretic J., Hughes S.R. *et* Craig A.D. (2008). Diversity in the genus *Melilotus* for tolerance to salinity and waterlogging. *Plant and Soil*. 304: 89-101.
- Rogers M.E., Colmer T.D., Frost K., Henry D., Cornwall D., Hulm E., Hughes S.R., Nichols P.G.H. *et* Craig A.D. (2009). The influence of NaCl salinity and hypoxia on aspects of growth in *Trifolium* species. *Crop and Pasture Science*. 60: 1–82.
- Rogers M.E., Colmer T.D., Nichols P.G.H., Hughes S.R., Frost K., Cornwall D., Chandra A., Miller S.M.F. *et* Craig A.D. (2011). Salinity and waterlogging tolerance amongst accessions of messina (*Melilotus siculus*). *Crop and Pasture Science*. 62: 225-235
- Rohde A., Morreel K., Ralph J., De Rycke R., Kushnir S., Van Doorsselaere J., Goeminne G., Joseleau J.P., Vuylsteke M., Van Driessche G., *et al.* (2004). Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell*. 16: 2749–2771.
- Rubinigg M., Wenisch J., Elzenga J.T.M. *et* Stulen I. (2004). NaCl salinity affects lateral root development in *Vitis vinifera* L. *Functional Plant Biology*. 31: 775-780.
- Rumbaugh B., Pendery M. *et* James D.W. (1993). Variation in the salinity tolerance of strawberry clover (*Trifolium fragiferum* L.). *Plant Soil*. 153:265-271.
- Sadiki M., Rubiales D. *et* Romero B. (2005). First report of *Orobanche foetida* on common vetch (*Vicia sativa*) in Morocco. *Plant Disease*. 89 : 528-529.
- Sannazzaro A.I., Oscar A.R., Edgardo O.A. *et* Menendez A.B (2006). Alleviation of salt stress in *Lotus glaber* by *Glomus* Intraradices. *Plant Soil*. 285:279–287.
- Schumpp O., Crèvecoeur M., Broughton W. *et* Deakin W.J. (2009). Delayed maturation of nodules reduces symbiotic effectiveness of the *Lotus japonicus*-*Rhizobium* sp. NGR234 interaction. *Journal of Experimental Botany*. 60: 581-90.
- Shackell G.H., Kelly R.W. *et* Johnstone P.D. (1993). Effects of prolonged exposure of ewes to oestrogenic pasture. Permanent flock infertility following long-term grazing of red clover (Grasslands Pawera) dominant pasture, New Zealand *Journal of Agricultural Research*. 36: 451–7.
- Shaoliang C., Jinke L., Tianhua W., Shasheng W., Andrea P. *et* Aloys H. (2002). Osmotic Stress and Ion-Specific Effects on Xylem Abscissic Acid and the Relevance to Salinity Tolerance in Poplar. *Journal of Plant Growth Regulation*. 21: 224-233.
- Shia Y., Yichao W., Timothy J. *et* Haijun G. (2013). Silicon decreases chloride transport in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions. *Journal of Plant Physiology*: 1008- 1016.

- Sibole J.V., Cabot C., Poschenrieder C. et Barceló J. (2003). Efficient leaf ion partitioning; an overriding condition for abscisic acid - controlled stomatal and leaf growth responses to NaCl salinization in two legumes. *Journal of Experimental Botany*. 390: 2111-2119.
- Sinchez-Blanc M.J., Morales M.A., Torrecillas A. et Alardn J.J. (1998). Diurnal and seasonal osmotic potential changes in *Lotus conimbricensis* plants grown under saline stress. *Plant Science*. 136: 1-10.
- Slama A.D., Afifi W.M., Mousa A.Z. et Shams El Din. (1992). Biochemical study on the effect of salinity on cucumber seedlings. *Annals Of Agricultural Science*. 37: 339-349.
- Suttie J.M. (2000). Hay and straw conservation for small-scale and pastoral conditions. *FAO Plant Production and Protection Series*. 29, 303 p.
- Smith S.R., Bouton J.H., Singh A. et McCaughey W.P. (2000). Development and evaluation of grazing-tolerant alfalfa cultivars: A review. *Canadian Journal of Plant Science*. 80: 503-512.
- Smith S.R. (2004). Advantages of grass-legume mixtures for beef Production. Chapter 2: Literature Review. 51 p
- Snowball R. et Kris G. (2005). Collecting Pasture Legumes in Morocco. A report to the Minister of Agriculture Forestry and Fisheries on a germplasm collecting mission to Morocco. Department of Agriculture and Food, Western Australia. 15 p.
- Spollen W.G., Le Noble M.E., Bernstein N. et Sharp R.E. (2000). Absciscic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*. 122: 967-976;
- Sraïri M. T. et El Khattabi M. (2001). Evaluation économique et technique de la production laitière intensive en zone semi-aride au Maroc. *Cahiers Agricultures*. 10 (1) : 51-55.
- Sreenivasulu N., Grimm B., Wobus U. et Weschke W. (2000). Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*), *Plant Physiology*. 109: 435-442.
- Steiner J.J. et Garcia De Los Santos G. (2001). Adaptative Ecology of *Lotus corniculatus* L. Genotypes: I. Plant Morphology and RAPD Marker Characteriaztions. *Crop Sciences*. 41: 552-563.
- Stepien P. et Johnson G.N. (2009). Contrasting Responses of Photosynthesis to Salt Stress in the Glycophyte *Arabidopsis* and the Halophyte *Thellungiella*: Role of the Plastid Terminal Oxidase as an Alternative Electron Sink. *Plant Physiology*. 149: 1154-1165.
- Strizh I (2008). The Mehler Reaction as an Essential Link Between Environmental Stress and Chloroplast Redox Signaling Photosynthesis. 19: 1343-1346.
- Szabados L. et Savoure A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*. 15: 89-97.

- Taeb M., Koebner R.M.D., Forster B.P. et Law C.N. (2000). Association between genes controlling flowering time and shoot sodium accumulation in the *Triticeae*. *Plant and Soil*. 146: 117-121.
- Taky A., Mailhol J.C., Debbarh A., Bouarfa S., Hammani A., Ruelle P., Belabbès K. et Bouaziz A. (2006). Impacts des pratiques d'irrigation sur le ruissellement au niveau de la plaine du Gharb. Economies d'eau en Systèmes Irrigués au Maghreb. Deuxième atelier régional du projet Sirma, Marrakech, Maroc, 29-31 mai
- Tattini M., Remorini D., Pinelli P., Agati G., Saracini E., Traversi M.L. et Massai R. (2006). Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. *New Phytologist*. 170: 779–794.
- Taylor R.N., Crombeholve W.R., Fridman S.A., Jons L.A., Casal D.C. et Roberts J.M. (1991). High plasma cellular fibronectin levels correlate with bio chemical and clinical features of preeclampsia but cannot be attributed to hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165: 895-901.
- Taylor N.L. et Smith R.R. (1990). Collection and Identification of *Trifolium* germplasm in Yugoslavia. In: Proc. 11th *Trifolium* Conference, Sublimity, OR. 9-11.
- Tazi M. (1999). Forage and pasture seed production and supply in the Near East and North Africa. Workshop on Seed Policy and Programs. Cyprus.
- Teakle N.L., Real D. et Colmer T.D. (2006). Growth and ion relations in response to combined salinity and waterlogging in the perennial forage legumes *Lotus corniculatus* and *Lotus tenuis*. *Plant and Soil*. 289: 369-383.
- Teakle N.L., Amtmann A., Real D. et Colmer T.D. (2010). *Lotus tenuis* tolerates combined salinity and waterlogging: maintaining O₂ transport to roots and expression of an NHX1-like gene contribute to regulation of Na⁺ transport. *Physiologia Plantarum*. 139: 358-374.
- Tester M. et Davenport R. (2003). Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. *Annals of Botany*. 91: 503-527.
- Tilak K., Ranganayaki N., Pal K., Saxena A.K., Shekhar Nautiyal C., Mittal S., Tripathi A.K., Johri B.N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*. 89: 136-150.
- Timothy D., Colmer T.D., Timothy J., Flowers A. et Munns R. (2006). Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 57: 1059-1078.
- Tobe K., Zhang L., Yu Qiu G., Shimizu H. et Omasa K. (2001). Characteristics of seeds germination in five non-halophytic Chinese desert shrub species. *J. of Arid. Envir.* 47: 191-201.
- Tokihiko N., Masatomo K., Yoshu Y., Yoshitaka K., Kazuko Y.S., Kazuo S. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 19 : Pages 205–210.

- Tremblin G. et Binet P. (1990). Halophilie et résistance au sel chez *Halopepelis amplexicaulis* (Vahl). Ung. Oecol. Plant. 5: 291-293.
- Turner L.B. (2000). The extent and pattern of osmotic adjustment in white clover (*Trifolium repens* L.) during the development of water stress. Ann. Bot. 66: 721-727
- Unni S. et Rao K.K. (2001). Protein and lipopolysaccharide profiles of a salt-sensitive *Rhizobium* sp. and its exopolysaccharide-deficient mutant. Soil Biology & Biochemistry. 33: 111-115.
- Uranbey S., Sevimay C.S., Özcan S. (2005). Development of high frequency multiple shoot formation in Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 80: 229-232.
- Valentovič P., Luxová M., Kolarovič L. et Gašparíková O. (2006). Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars Plant, Soil and Environment. 52: 186–191.
- Valiente C.L., Estrellés E., Soriano P. et Picó J. (2007). Germinative response of *Lotus creticus* to different temperatures and salinity conditions. Lotus Newsletter. 37: 69–70.
- Van Assche J.A., Katrien L., Debucquoy A., Wouter A. et Rommens F. (2003). Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some *Leguminosae* (*Fabaceae*). Laboratory of Plant Ecology. New Phytologist. 158: 315 - 323.
- Van Huylenbroeck J.M., Lootens P. et Van Bockstaele E. (1999). Photosynthetic characteristics of perennial ryegrass and red fescue turf-grass cultivars. Blackwell Science Ltd. Grass and Forage Science. 54: 267-274.
- Van Zandt P. et S. Mopper. (2002). Delayed and carryover effects of salinity on flowering in *Iris hexagona* (*Iridaceae*). American Journal of Botany. 89: 364-383.
- Varshney R.K., Hiremath P.J., Lekha P.T., Kashiwagi J., Jayasree B., Deokar A.A., Vadez V., Xiao Y., Srinivasan R., Gaur P.M., Siddique K.H.M., Town C.D. et Hoisington D.A. (2009). A comprehensive resource of drought- and salinity- responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L). BMC Genomics 10 (523). 18p.
- Verslues P.E., Manu A., Surekha K.A, Jianhua Z., Zhu J.K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. The Plant Journal. 45: 523–539.
- Vetter J. (2004). Isoflavones in different parts of common *Trifolium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43: 106–108.
- Walker R.R. et Douglas T.J. (1996). Effect of salinity level on uptake and distribution of chloride sodium and potassium ions in *Citrus* plants. Australian Journal of Agricultural Research. 34: 145-53.

- Wang G., Shia S.K., Francis O.J., Ware G.M. et Carman A.S. (2002). A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 185-190
- Waters C.M., Loch D.S. et Johnston P.W. (2001). The role of native grasses and legumes for land revegetation in central and eastern Australia with particular reference to low rainfall areas. *Tropical Grasslands*. 31: 304–310.
- Winicov I., Babu V., Lingru X. et Kenneth H. (2004). The MsPRP2 promoter enables strong heterologous gene expression in a root-specific manner and is enhanced by overexpression of *Alfin 1*. *Planta*. 219 : 925-935.
- Yan A.M., Wang E.T, Kan F.L, Tan Z., Sui X.H, Hurek R.B et Chen W.X. (2000). *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50 : 1887-1891.
- Yates R.J., Howiesona J.G., Reeve W.G. Brau L. *et al.* (2008). Host–strain mediated selection for an effective nitrogen-fixing symbiosis between *Trifolium* spp. and *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry*. 40 : 822–833.
- Zahran H. H. (2000). *Rhizobium* -legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63: 968-989.
- Zgallai H., Steppe K. et Lemeur R. (2007). Étude des caractères morphologiques des plantes de tomate soumises à un déficit hydrique en milieu hydroponique Science et changements planétaires. *Sécheresse*. 18 : 57-64.
- Zatout M. (1995). Contribution à l'étude de la répartition des espèces spontanées du *Trifolium* en Algérie. Thèse de Magister, INA El Harrach.
- Zhang B. et Archbold D.D. (1993). Solute accumulation in leaves of a *Fragaria chiloensis* and a *F. virginiana* selection responds to water deficit stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 118: 280-285.
- Zhao J. et al. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23:283-333.
- Zhu J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol* 53: 247-273.
- Zouhri L., Toto E., Carlier E. et Debieche T.H. (2013). Salinité des ressources en eau: intrusion marine et interaction eaux–roches (Maroc occidental). *Hydrological Sciences Journal*. 8 : 55-58.

ANNEXES

Annexe 1. Caractéristiques morphologiques et agronomiques des écotypes testés (essai 2007-2008)

Espèce	Ecotype	HP (cm)	TF (cm)	F (jours)	IP	GI	PMG (g)	PG (g)	MS (g/m²)	Rouille	Oïdium	Précocité à la F
<i>T. arvense</i>	a4	25	0,35	67	300	30	0,32	21,75	97	2	1	Très précoce
	a7	70	0,3	67	255	26	0,26	22	132	3	2	Très précoce
	a11	68	0,28	70	325	30	0,37	26,79	100	3	0	Très précoce
	a12	63	0,19	70	210	70	0,37	10,38	129	4	0	Très précoce
	a15	60	0,22	89	111	65	0,43	10,38	122	3	1	°Précoce
	a16	45	0,2	80	120	50	0,41	19,09	130	3	0	Précoce
	a17	34	0,12	86	320	68	0,35	20,93	130	3	0	Précoce
	a18	45	0,14	90	120	52	0,16	20,32	130	4	0	Précoce
	a19	50	0,19	102	212	50	0,44	19,95	134	5	0	Tardive
	Moy	52,2±4,85	0,23±0,07	81±2,22	203±9,36	48±7,14	0,35±0,01	19,78±5,63	128±4,09			
CV%	48,93	25,77	4,98	21,23	16,91	9,19	17,26	9,72				
<i>T. bocconei</i>	b4	11,08	0,15	68	98	15	1,02	7,78	98	1	0	Très précoce
	b5	12,12	0,18	69	98	19	1,04	8	100	2	0	Très précoce
	b6	11	0,18	69	90	11	1,02	7,8	120	2	1	Très précoce
	b7	13,24	0,2	77	95	11	0,99	7,96	99	0	1	Précoce
	b12	12	0,2	80	90	15	0,8	7,82	112	2	0	Précoce
	b13	12	0,15	89	98	15	0,82	9,2	120	5	1	Précoce
	b14	12	0,18	92	98	15	0,82	8	120	5	1	Semi- précoce
	Moy	12,00±0,74	0,18±0,02	79±3,11	96±3,77	15±0,27	0,95±0,01	8,00±0,05	110±0,58			
	CV%	6,27	11,62	10,69	3,96	19,13	11,86	6,22	9,61			
	<i>T. campestre</i>	c1	20	1,5	100	131	10	0,56	18,65	269	0	7
c2		20	0,6	100	122	12	0,47	15,36	256	0	3	Semi-précoce
c3		26	1,08	87	136	16	0,91	20	248	0	3	Précoce
c4		36	1,23	99	138	12	0,3	22,9	269	1	6	Semi-précoce
c11		20	1,18	120	126	28,5	0,157	18,39	233	1	7	Très tardive
c12		20	1	108	92	32	0,9	36	242	1	6	Tardive
c13		23	1,11	106	88	30	0,93	28	274	0	0	Tardive
c15		25	0,5	100	90	21	0,7	30	260	1	2	Semi-précoce
c17		22	1,2	138	138	16	0,7	30	235	1	5	Très tardive
Moy		23,70±0,49	1,08±0,03	107±2,9	117±14,47	20±6,39	0,68±0,02	27,47±0,65	254±1,38			
CV%	11,01	10,09	5,972	13,57	13,98	10,08	28,7	6,36				
* <i>T. m</i>												
	*P	72,1	2	90	94	20	0,73	29	1000	1	0	Précoce

* T.m : *Trifolium michelianum* ; P : Paradana

Annexe 1 (suite). Caractéristiques morphologiques et agronomiques des écotypes testés (essai 2007-2008)

Espèce	Ecotype	HP (cm)	TF (cm)	F (jours)	IP	GI	PMG (g)	PG (g)	MS (g/m²)	Rouille	Oïdium	Précocité à la F	
<i>I. cherleri</i>	ch4	30	1,6	110	70	25,5	1,464	11,15	311	0	3	Tardive	
	ch5	16	0,9	90	121	11	1,16	12,6	299	0	4	Précoce	
	ch8	17,5	1,4	114	100	10,5	1,1	10	369	0	4	Tardive	
	ch10	28	1	114	62	25	1,8	11,15	283	1	4	Tardive	
	ch11	32	1	106	121	25	1,75	10	210	1	3	Tardive	
	ch12	32	1,2	100	60	15,5	0,617	8,679	356	0	3	Semi-précoce	
	ch19	17,8	1,11	97	70	15	0,617	14,6	350	1	2	Semi-précoce	
	ch20	20	0,9	95	100	13	0,75	12	406	1	0	Semi-précoce	
	Moy	24,73±2,96	1,12±0,02	103±0,71	89±5,56	17±2,07	1,15±0,04	11,28±1,27	320±1,5				
	CV%	29,43	33,4	5,26	19,29	9,632	12,68	10,66	19,29				
<i>I. glomeratum</i>	g1	50	2,9	100	167	56	0,25	29,02	447	1	3	Semi-précoce	
	g2	60,5	1,9	100	68	49	0,2	25,49	556	1	2	Semi-précoce	
	g3	60	1,8	109	169	39	0,5	28,021	341	1	2	Tardive	
	g4	50	2	106	140	32,8	0,75	39,73	318	0	0	Tardive	
	g7	40	2	110	140	24,5	0,92	39	500	7	4	Tardive	
	g11	60	2,8	110	72	20	0,321	25,97	603	9	6	Tardive	
	g12	41	1,7	116	173	22,5	0,7	23,83	600	8	5	Tardive	
	g13	80	1,7	119	74	29,67	0,51	32,56	464	8	7	Tardive	
	g14	50	1,7	90	72	56	0,75	39	500	0	4	Semi-précoce	
	g15	70	2,2	90	72	49	0,75	38	654	2	4	Semi-précoce	
	g16	88	2,3	135	72	39	0,75	38	500	3	2	Tardive	
	g17	89,7	2,8	149	90	39	0,75	38	381	3	3	Tardive	
	Moy	60,06±3,38	2,20±0,05	111±8,99	110±4,44	34±2,56	0,69±0,23	36,04±6,20	482±5,68				
	CV%	30,02	19,73	48,53	10,32	15,27	24,63	24,97	6,874				
	<i>I. scabrum</i>	sc1	26	0,8	90	80	15	0,12	18,8	188	3	4	Précoce
		sc2	20,8	1,02	90	78	23,4	0,58	8,72	179	1	7	Précoce
		sc3	25	1	73	77	20	0,26	13	191	3	8	Précoce
Moy		23,40±2,75	1,00±0,12	86±9,81	78±0,57	19±4,22	0,32±0,03	13,43±5,37	184±8,48				
CV%		1,15	1,29	11,64	0,74	21,71	73,69	40,40	4,56				

Annexe 1 (suite). Caractéristiques morphologiques et agronomiques des écotypes testés (essai 2007-2008)

Espèce	Ecotype	HP (cm)	TF (cm)	F (jours)	IP	GI	PMG (g)	PG (g)	MS (g/m ²)	Rouille	Oïdium	Précocité à la F
<i>T. ischnocarpum</i>	i1	70,5	2,2	70	184	26	1,19	41,08	780	3	0	Précoce
	i2	80	2,8	68	100	32,75	2,58	35,08	630	4	2	Très précoce
	i3	84,9	2,6	79	170	30	1,24	38,11	890	4	0	Précoce
	i4	96	3,6	90	250	33	1,25	40,8	1000	4	1	Précoce
	i5	80	1,5	96	160	21	2,35	39,72	1020	4	0	Semi-Précoce
	i6	89	3,8	99	137	25,42	2,59	30	1060	0	7	Semi-Précoce
	i7	95,6	3,9	85	231	18	1,99	29,99	1108	2	0	Précoce
	i8	97,8	4,8	88	190	34	1,76	36,21	1110	2	0	Précoce
	i10	97,2	3,8	79	133	40	3,61	35,32	1120	0	6	Précoce
	i11	96	1,82	80	255	18	1,19	21,08	1200	1	4	Précoce
	i12	90	2,23	80	160	18	2,58	15,082	1200	1	7	Précoce
	i13	66	2,78	110	137	20	1,24	18,11	900	0	5	Tardive
	i14	60	3,99	90	233	20	1,25	20,8	987	3	8	Précoce
	i15	78	1,78	100	190	30	2,35	19,24	997	4	1	Semi-Précoce
	i16	90	1,9	107	133	33	2,9	10	997	4	1	Tardive
	i17	70	2,8	110	284	33,89	1,99	9,99	1100	6	0	Tardive
	i18	86,5	3	99	290	20,13	1,76	16,21	1200	4	0	Semi-Précoce
	i19	60	3	110	100	17,45	2	15,32	1225	5	0	Tardive
	i20	70	3,89	118	100	17,99	3,1	15,78	800	5	0	Tardive
	Moy	82,7±6,39	3,69±0,92	99±4,53	189±11,13	25±2,39	2,05±0,08	29,02±2,51	1020±16,7			
	CV%	22,98	10,18	17,92	31,18	39,65	24,71	21,81	22,27			
<i>T. resupinatum</i>	r4	70	1,5	71	89	45	0,55	28,3	589	5	7	Précoce
	r5	40,88	2,2	100	110	35,4	0,69	51,64	690	3	4	Semi-précoce
	r6	70	2,6	87	110	37	2,22	19,6	352	1	2	Précoce
	r7	60,8	2,8	87	164	40	1	20,15	899	7	6	Précoce
	r8	70	3,6	100	246	36	0,97	33,3	412	4	3	Semi-précoce
	r10	60,43	3,8	112	180	29,6	2,22	48,03	520	5	3	Tardive
	r12	70	2,98	125	110	10	0,71	17,24	817	7	6	Très tardive
	r13	40,7	3	98	129	33,67	0,4	40,24	400			Semi-précoce
	Moy	60,35±2,75	2,80±0,73	97±6,48	145±15,81	33±8,45	1,07±0,07	32,31±13,2	586±15,69			
	CV%	26,06	33,07	39,38	0,522	18,85	4,6	12,86	27,77			

Annexe 1 (suite). Caractéristiques morphologiques et agronomiques des écotypes testés (essai 2007-2008)

Espèce	Ecotype	HP (cm)	TF (cm)	F (jours)	IP	GI	PMG (g)	PG (g)	MS (g/m ²)	Rouille	Oïdium	Précocité à la F
<i>F. stellatum</i>	st7	60	0,8	70	94	16	0,61	13,54	89	0	4	Très précoce
	st8	50,3	0,88	101	90	17	0,6	14,7	203	0	4	Très tardive
	st10	40,5	0,8	106	86	16,5	0,66	6,68	97	4	4	Tardive
	st11	50	0,8	107	97	16	0,7	14,031	104	4	3	Tardive
	st12	50	1	130	78	19	0,56	13	92	3	3	Très tardive
	st16	50	0,78	104	90	16	0,7	15,265	148	4	2	Tardive
	Moy	50,18±6,16	0,80±0,08	104±9,22	90±6,64	16±1,17	0,62±0,05	12,44±3,13	122±5,11			
<i>F. tomentosum</i>	CV%	12,53	0,08	13,49	0,02	2,67	6,33	0,02	31,91			
	t1	20	0,99	86	70	22,5	0,15	15,72	337	8	5	Précoce
	t2	28	0,88	70	86	20	0,2	14,62	470	8	7	Précoce
	t3	20	1	80	100	28,5	0,5	13,4	440	8	5	Précoce
	t4	30,5	0,8	93	97	16	0,2	18,36	250	7	5	Semi-Précoce
	t8	28	1,2	88	70	11,4	0,1	23,24	476	7	4	Précoce
	t10	30	0,9	100	80	25	0,27	16,72	200	6	5	Semi-Précoce
<i>L. ornithopodioides</i>	t11	30,3	0,8	112	120	24,67	0,5	15,16	234	7	4	Tardive
	t12	30,7	0,8	70	70	27,8	0,85	23,61	480	9	7	Précoce
	Moy	28,83±4,56	0,92±0,13	86±14,31	87±8,02	22±5,91	0,32±0,02	17,52±3,92	362±19,79			
	CV%	10,60	17,64	13,21	14,01	12,89	22,56	19,85	12,42			
	o8	80	2,1	110	79	20	0,7	36	856	2	0	Tardive
	o9	70	2	110	100	16	0,7	36,4	904	0	0	Tardive
	o10	90	2,1	110	100	17	0,9	39	845	0	0	Tardive
<i>L. ornithopodioides</i>	o12	60	2,4	120	100	19	0,8	36	980	1	0	Très tardive
	o13	70	2,3	80	79	20	0,98	32,5	900	1	1	Précoce
	o14	50	3,1	100	80	16	1,16	24	990	1	2	Semi-précoce
	o15	80	2,2	106	70,5	17	0,78	36,4	910	2	0	Tardive
	o16	60	2,1	79	71,2	19	1,14	31	900	1	1	Précoce
	o17	70	2	139	80	19	1,11	30	900	0	0	Très tardive
	o18	80	1,8	120	88	23	0,234	41,93	854	0	1	Très tardive
	o20	90	1,6	142	50	12	0,373	40,97	852	0	0	Très tardive
	Moy	75,08±2,25	2,00±0,71	110±20,09	85±12,22	18±1,61	0,98±0,01	33,76±4,60	900±8,97			
	CV%	14,02	14,26	30,79	13,49	14,82	15,53	61,25	13,55			

Annexe 2. Pourcentage de graines dures ainsi que d'imbibition et de germination des écotypes testés du trèfle et lotier après 21 jours d'incubation à l'obscurité dans un incubateur réglé à 25°C avec une humidité variante de 78% à 93%.

Espèce	Ecotype	% Graines dures	% Graines imbibées sur 0 mM	% Graines imbibées sur 220 mM	% Graines imbibées et ayant germées sur 0 mM	% Graines imbibées et ayant germées sur 220 mM
<i>T. arvense</i>	a7	10,7	89,3	88,6	66,9	28,7
<i>T. bocconeii</i>	b6	4,7	95,3	93,3	91,4	13,4
<i>T. campestre</i>	c4	10,7	89,3	81,3	80,6	28,6
	c17	25,4	74,6	74,6	90,4	21,4
<i>T. cherleri</i>	ch5	13,3	86,7	86,0	69,5	71,3
	ch19	7,3	92,7	90,7	94,0	96,0
	ch20	13,3	86,7	78,7	83,2	81,2
<i>T. glomeratum</i>	g2	28,0	72,0	72,0	93,0	24,0
	g4	59,2	40,8	45,8	79,1	0,0
	g14	73,9	26,1	21,5	91,8	0,0
	g15	8,5	91,5	89,5	92,8	94,8
<i>T. isthmocarpum</i>	i1	82,7	17,3	20,0	74,2	32,8
	i2	81,3	18,7	16,0	82,0	0,0
	i3	58,0	42,0	47,0	80,3	0,0
	i4	72,7	27,3	2,7	73,0	0,0
	i6	74,0	26,0	28,0	94,0	88,0
	i7	33,3	66,7	66,0	49,5	51,3
	i8	27,3	72,7	70,7	74,0	11,2
	i10	33,3	66,7	58,7	63,2	76,0
	i11	72,7	27,3	22,7	93,0	0,0
	i12	82,5	17,5	14,8	80,8	0,0
	i19	70,1	29,9	25,3	90,4	0,0
<i>T. resupinatum</i>	r4	14,5	85,5	77,5	82,0	30,0
	r5	78,7	21,3	18,6	79,4	0,0
	r7	55,4	44,6	49,6	77,7	0,0
	r8	80,1	19,9	22,6	71,6	30,2
	r12	29,2	70,8	70,8	91,8	22,8
<i>T. scabrum</i>	sc1	55,0	45,0	40,0	90,0	90,0
	sc2	50,0	50,0	48,0	80,0	92,0
	sc3	48,0	52,0	52,0	73,0	84,0
<i>T. stellatum</i>	st7	87,3	12,7	12,8	54,2	0,0
	st8	88,7	11,3	4,0	62,0	0,0
<i>T. tomentosum</i>	t3	78,0	22,0	27,0	60,3	0,0
	t8	23,3	76,7	76,0	59,5	22,8
	t10	17,3	82,7	80,7	84,0	0,0
	t12	23,3	76,7	68,7	73,2	21,2
<i>L. ornithopodioides</i>	o8	38,0	62,0	62,0	83,0	14,0
	o9	92,7	7,3	10,0	64,2	61,3
	o10	91,3	8,7	6,0	72,0	0,0
	o16	68,0	32,0	37,0	70,3	86,0
<i>T. michelianum</i>	Paradana	82,7	17,3	12,7	83,0	0,0
<i>L.S.D</i>			5,5	4,8	3,8	1,7

Le pourcentage d'imbibition a été calculé sur le nombre total des graines, alors que le pourcentage de germination a été calculé à partir du pourcentage des graines imbibées

Annexe 3. Solution de Hoagland (Karmoker et Van Steveninck, 1978)

KH_2PO_4	0,5 mM
KNO_3	3 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4 mM
MgSO_4	1 mM
FeEDTA (EDTA iron III sodium salt)	37,5 μM
H_3BO_3	23 μM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,5 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,5 μM
MoO_3	0,05 μM

Annexe 4. Analyse Ultra-chromatographie en phase liquide (UPLC).

Le système ACQUITY UPLC : ultra-performance liquid chromatograph (Waters) est composé de gestionnaire de solvant binaire, gestionnaire de l'échantillon, détecteur à barrette de photodiodes (PDA), et le logiciel Empower Pro 2.0 a été utilisé.

Le profilage a été réalisée sur une colonne UPLC BEH C18 50 mm × 2,1 mm de diamètre, 1,7 mm, en utilisant un gradient profil d'élution et une phase mobile constituée par l'acide acétique à 0,1% dans l'eau (solvant A) et 40% MeCN (Solvant B). La forme du gradient utilisé était le suivant: 0 min, 100% de A; 1 min, 90% A; 7 min, 35% A; 7,5 min, 100% de B; 9,5 min, 100% de B, et 10 min, A. 100% La colonne est maintenue à 50°C, et le débit est maintenu constant à 0,35 ml/min. Le volume d'injection était 5 µL. Les profils d'UPLC ont été intégrés à 254 nm, et la forme du spectre d'absorption de chaque pic a été observée avec du PDA. Les aires des pics de la même forme ont été choisies, et la concentration a été déterminée pour chacun d'entre eux séparément sur la base des courbes d'étalonnage de la quercétine pour les flavonoïdes, la daidzine pour les isoflavones et le coumestrol pour les coumestanes.

La colonne CL (chromatographie liquide) était équilibrée à température ambiante. Les séparations ont été réalisées en utilisant une phase initiale mobile de 55% de méthanol dans 1mmol/L d'acétate d'ammonium (EM Science, Cherry Hill, HJ), s'élevant à 65% à 10min jusqu'à ce que la biochanine A soit éluée. Le débit était de 1mL/min. Le détecteur d'UV était réglé 214 nm pour détecter la formononétine, à 254 nm pour détecter la daidzéine respectivement. Vingt micro-litres de solution standard de méthanol mélangée ou d'échantillon ont été injectés et les zones de pics chromatographiques ont été calculées à l'aide du logiciel Axxi-Chrom Model 727 (Calabasas, CA).