



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة زيان عاشور-الجلفة

Université Ziane Achour -Djelfa

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم العلوم البيولوجية

Département de Biologie

Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité: Biotechnologie Végétale

Thème:

Réponses physiologiques et biochimiques de deux variétés de Trèfle (*Trifolium alexandrinum L.* et *Trifolium repens L.*) à la bio-fertilisation sous contrainte saline.

Présenté par : BOUZEKRI Zoubida

Soutenu devant le jury :

M ^r DAHIA M.	M.C (A)	Université de Djelfa	Président.
M ^{me} BENCHERIF K.	M.C (B)	Université de Djelfa	Promotrice.
M ^{me} HADADOU D.	M.A (A)	Université de Djelfa	Examinatrice.
M ^{me} OUALHA D.	M.A (A)	Université de Djelfa	Examinatrice.

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciements

En premier lieu, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir accordée le courage et la force de mener à bien ce modeste travail.

*Au terme de cette étude, mes reconnaissances respectueuses vont d'abord à **Mme. BENCHRIF Karima** Maître de conférences à l'université de Djelfa, pour avoir accepté de m'encadrer ainsi que pour ses précieux conseils et orientations, sa disponibilité, sa gentillesse, sa modestie et pour l'intérêt bienveillant manifesté pour mon travail.*

*Je remercie **Mr. DAHIA Mostefa** Maître de conférences à l'université de Djelfa pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.*

*Je remercie également **Mme. HADADOU Djamila** Maître assistante à l'université de Djelfa et **Mme. OUALHA Dalila**, Maître Assistante à l'université de Djelfa d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Je remercie **Mr. BEN HAMIDA Aissa & MOUKHTARI Zineb** du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie « département de biologie » de l'université de Djelfa.*

*Il m'est agréable d'exprimer ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements envers mes deux sœurs : **Mme. BOUZEKRI Sara** PhD à l'université des sciences et de la technologie Houari Boumédiène d'Alger & **Mme. BOUZEKRI Madiha Ahlam** Maître Assistante à l'université de Djelfa.*

*“Two roads diverged in a wood, and I —
I took the one less travelled by,
And that has made all the difference”.*
(« *Deux routes se séparaient dans un bois,
Et moi, je pris la moins empruntée.
Cela fit toute la différence* »).

ROBERT FROST
THE ROAD NOT TAKEN – 1916.



Liste des abréviations

μ : Micro.

μL : Microlitre.

μmol : Micromole.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AlPO₄: Aluminium phosphate.

ATP: Adénosine-Triphosphates.

BSA: Bovine Serum Albumin.

Ca²⁺: Calcium.

CaPO₄: Calcium orthophosphates.

Cl⁻ : Chlorure.

CMA : Champignons Mycorhiziens Arbusculaires.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

CO₃²⁻ : Carbonate.

Cu : Cuivre.

DM/ha: Dry matter par hectare.

DO: Densité optique.

F.A.O.: Food and Agriculture Organisation of the United Nations.

Fe²⁺ : Fer.

FePO₄ : Orthophosphate de fer.

H⁺ : Hydrogène.

H₂O₂ : Eau oxygénée.

H₃PO₄ : Acide phosphorique.

Ha : Hectare.

HCl : Acide chlorhydrique.

HCO₃⁻ : Bicarbonate.

HNO₃ : Acide nitrique.

INRA : Institut National de la Recherche Agronomiques.

K⁺ : Potassium.

KH₂PO₄ : Phosphate de monopotassium.

MF : Matière fraîche.

mg/kg : Milligramme par kilogramme.

Mg²⁺ : Magnésium.

mM : Millimole.

Mn²⁺ : Manganèse.

MnO₄ : Permanganate.

N : Azote.

N/ha : Azote par hectare.

N₂ : Diazote.

Na⁺ : Sodium.

NaCl : Chlorure de sodium.

NCC : Nécrose du Cortex Cérébral.

NH₄⁺ : Ammonium.

nm : Nanomètre.

NO₃⁻ : Nitrate.

NRA : L'activité du nitrate réductase.

pH : Potentiel hydrogène.

POX : Peroxydase.

PPase : Pyrophosphatase.

PSU : Pratical Salinity Unit (l'unité de salinité pratique).

Qx/Ha : Quintaux par hectare.

SAU : Surface Agricole Utile.

SO₄²⁻ : Sulfate.

tr/min : Tour par minute.

UF/ha : Unité Fourragère par hectare.

UF/kg : Unité Fourragère par kilogramme.

UFL : Unité Fourragère Lait.

Zn²⁺ : Zinc.

Liste des figures

Figure 1: Classification phylogénique des Légumineuses (DOYLE <i>et al.</i> , 1998).....	11
Figure 2: Distribution géographique du genre <i>Trifolium</i>	18
Figure 3: Fleur du trèfle d'alexandrie (<i>Trifolium alexandrinum L.</i>).....	20
Figure 4: Fleur du trèfle blanc (<i>Trifolium repens L.</i>).....	25
Figure 5: Mise en place du dispositif expérimental.....	41
Figure 6: Dosage des protéines totales.....	42
Figure 7: Dosage du phosphore par colorimètre Selon (TAUSK et SHORR., 1963).....	43
Figure 8: Dosage des éléments minéraux Selon (PAUWELS <i>et al.</i> , 1992).....	44
Figure 9: Dosage de chlorophylle.....	45
Figure 10: Dosage de la proline.....	46
Figure 11: Dosage enzymatique de catalase.....	47
Figure 12: Dosage enzymatique de peroxydase.....	47
Figure 13: Résultats des paramètres de croissances des deux espèces de Trèfles dans les deux types de sols salins étudiés.....	49
Figure 14 : Résultats du dosage des protéines des deux espèces de Trèfles étudiées.....	49
Figure 15: Résultats du dosage du phosphore chez les deux espèces de Trèfles étudiées.....	50
Figure 16: Résultats du dosage des éléments minéraux Na et K dans les parties aériennes des deux espèces de Trèfles étudiées.....	51
Figure 17: Résultats du dosage des éléments minéraux Na et Cl dans les parties aériennes des deux espèces de Trèfles étudiées.....	51

Figure 18: Résultats du dosage de chlorophylles des parties aériennes des deux espèces de Trèfles étudiées.....	52
Figure 19: Résultats du dosage de la Proline chez les deux espèces végétales étudiées.....	53
Figure 20: Résultats du dosage de l'activité enzymatique Catalase.....	53
Figure 21: Résultats du dosage de l'activité enzymatique Peroxydase.....	54

Liste des tableaux

Tableau 1: Légumineuses alimentaires cultivées en Algérie: leur importance en superficie, production et rendement (M.A. 1993-2002).....	14
Tableau 2: Répartition des surfaces (10 ³ ha) consacrées aux fourrages en Algérie (HOUMANI., 1999).....	15
Tableau 3: Classification du genre <i>Trifolium</i> proposée par ELLISON et al., (2006) comparée à celle de ZOHARY et HELLER., (1984).....	17
Tableau 4: Classification de l'espèce <i>Trifolium alexandrinum</i> L.....	21
Tableau 5: Classification de l'espèce <i>Trifolium repens</i> L.....	26
Tableau 6: Différents micro-organismes utilisés dans la Production de bio-fertilisant (RITAIKA et UPTAL., 2014).....	32
Tableau 7: Caractéristiques agro pédologiques et bioclimatique du site de prélèvement.....	40
Tableau 8: L'interaction entre les espèces de trèfles, le sol et les traitements d'inoculation.....	55

Sommaire

- **Remerciements**
- **Dédicace**
- **Liste des abréviations**
- **Liste des figures**
- **Liste des tableaux**

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	4
I. Généralité sur le stress et la salinité chez les végétaux.....	4
I.1. Définition d'un stress.....	4
I.2. Définition de la salinité.....	4
I.3. Effet de la salinité sur les plantes.....	5
I.3.1. Effet de la salinité sur l'eau dans la plante.....	5
I.3.2. Effet de la salinité sur la germination.....	6
I.3.3. Effet de la salinité sur la croissance et le développement.....	6
I.3.4. Effet de la salinité sur le comportement biochimique de la plante.....	6
I.3.5. Effet de la salinité sur le métabolisme de l'azote.....	7
I.3.6. Effet de la salinité sur les processus physiologiques de la plante.....	8
I.3.7. L'effet osmotique.....	8
I.3.8. Effet de la salinité sur les pigments photosynthétiques.....	8
I.3.9. Effet de la salinité sur la morphologie des plantes.....	9
I.3.9.1. Effet de la salinité sur les racines.....	9
I.3.9.2. Effet de la salinité sur les tiges.....	9
I.3.9.3. Effet de la salinité sur les feuilles.....	9

I.4. Conséquences de la salinité sur la croissance et le développement de la plante...	10
II. Les légumineuses.....	10
II.1. Généralités.....	10
II.2. Principales caractéristiques des légumineuses.....	11
II.3. Les légumineuses en Algérie.....	12
II.4. Le genre <i>Trifolium</i> L.....	15
II.4.1. Taxonomie et Génétique.....	16
II.4.2. Origine et aire de Répartition.....	18
II.4.3. Description botanique.....	18
II.5. Caractères généraux des deux espèces étudiées.....	19
II.5.1. <u><i>Trifolium alexandrinum</i> L.</u>	19
II.5.1.1. Classification.....	21
II.5.1.2. Centre d'origine de l'espèce.....	22
II.5.1.3. La gestion du fourrage.....	22
II.5.1.4. Impact sur l'environnement.....	24
II.5.2. <u><i>Trifolium repens</i> L.</u>	24
II.5.2.1. Classification.....	26
II.5.2.2. Centre d'origine de l'espèce.....	27
II.5.2.3. La gestion du fourrage.....	27
II.6. L'effet de la salinité sur le trèfle.....	29
III. les biofertilisants.....	30
III.1. Définition.....	30

III.2. Différents types.....	30
III.3. Les bio-fertilisants à base de champignons arbusculaires.....	33
III.3.1. Transfert du phosphore.....	33
III.3.2. Transfert de l'azote.....	34
III.3.3. Transfert des oligo-éléments du CMA à la plante.....	35
III.3.4. Les intérêts des CMA dans la résistance des plantes aux stresses biotiques et abiotiques.....	35
III.3.4.1. Résistance aux stress biotiques.....	35
III.3.4.2. Résistance aux stress abiotiques.....	37
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	39
I. Matériel.....	39
I.1. Matériel végétal et fongique.....	39
I.2. Le substrat.....	39
II. Méthodes.....	40
II.1. Préparation du substrat de culture.....	40
II.2. Traitement d'inoculation.....	40
II.3. Dispositif expérimental.....	41
II.4. Estimation des paramètres de croissance.....	41
II.5. Dosage des protéines totales solubles.....	42
II.6. Dosage des éléments minéraux.....	42
II.6.1. Dosage du phosphore.....	42
II.6.2. Dosage des minéraux libres Na ⁺ , Cl ⁻ et K ⁺	43
II.7. Dosage de la chlorophylle.....	44

II.8. Dosage de la proline.....	45
II.9. Estimation des activités enzymatiques.....	46
II.9.1. La catalase.....	46
II.9.2. Le peroxydase.....	47
II.10. Isolement et quantification des spores des CMA.....	48
II.11. Analyses statistique.....	48
Chapitre III : Résultats et discussion.....	49
I. Résultats.....	49
I.1. Paramètre de croissance.....	49
I.2. Dosage des protéines totales solubles.....	49
I.3. Dosage des éléments minéraux.....	50
I.3.1. Dosage du phosphore.....	50
I.3.2. Dosage des Na, Cl et K.....	50
I.4. Dosage de la chlorophylle.....	52
I.5. Dosage de la proline.....	52
I.6. Estimation des activités enzymatiques.....	53
I.6.1. Catalase.....	53
I.6.2. Peroxydase ‘‘POX’’.....	54
I.7. Analyse statistique.....	54
II. Discussion.....	56
➤ Conclusion.....	59
➤ Références bibliographiques.....	60
➤ Annexes	
➤ Résumé	

Introduction

Introduction

La salinité des sols, facteur limitatif majeur de la productivité agricole, résulte des processus naturels ou de l'irrigation des récoltes avec l'eau saline, elle caractérise plusieurs régions arides et semi arides du monde (LEVIGNERON *et al.*, 1995 ; MELONI *et al.*, 2004). Plus de 40% des sols dans le bassin méditerranéen, dont l'Algérie sont affectés par la salinité (CHEVERY *et ROBERT.*, 1993 ; HAMDY., 1999 ; Le HOUEROU., 2000 ; DREVON *et al.*, 2001 ; ANTIPOLIS., 2003). Cependant, l'irrigation des sols par une eau de haute qualité de sa source, est extrêmement coûteuse ; donc la sélection de plantes tolérantes à la salinité est une stratégie alternative, pour une agriculture correspondante à ces terres marginales (DREVON *et al.*, 2001). En effet, la salinité est un des facteurs d'environnement le plus important, elle limite la production des récoltes dans approximativement 50% des terres cultivées (MAOS., 1990 ; FLOWERS *et YEO.*, 1995 ; NEUMANN., 1997 ; YEO., 1998 ; HASEGAWA *et al.*, 2000 ; MUNNS., 2002). Elle conduit les plantes à la toxicité ionique, au stress osmotique, à la déficience minérale et à un nombre de perturbations physiologiques et biochimiques (NEUMANN., 1997 ; YEO., 1998 ; HASEGAWA *et al.*, 2000 ; MUNNS., 2002).

La salinité réduit l'accumulation de l'azote chez les plantes (GRATTAN *et GRIEVE.*, 1993) avec une accumulation des sucres totaux solubles et de la proline. De plus le métabolisme azoté et la synthèse protéique sont également sévèrement affectés par le stress salin (BENKHALED *et al.*, 2003).

Les plantes vasculaires terrestres sont capables d'établir des symbioses avec de nombreux micro-organismes. Au niveau des racines, les plantes peuvent s'associer avec des champignons mycorhiziens pour donner ce qu'on appelle des mycorhizes (PARMISKE., 2008). Les formes les plus répandues sont les endomycorhizes à arbuscules. En effet, ces symbioses ont été recensées chez 80% des plantes terrestres (SMITH. & READ., 2008). Elles sont établies entre les racines des plantes et des champignons appartenant au phylum des Glomeromycota (SCHÜßLER *et al.*, 2001) encore appelés champignons mycorhizogènes à arbuscules (CMA). Ces CMA permettant probablement la colonisation des terres émergées par les plantes supérieures grâce à l'amélioration de leur nutrition et à certaines adaptations (WANG *et al.*, 2010). Ils permettent une meilleure résistance de la plante aux stress environnementaux biotiques et abiotiques. L'utilisation des mycorhizes représente un

des enjeux majeurs pour une agriculture plus durable visant à réduire l'usage des pesticides et permettant une optimisation de la production végétale (qualitative et quantitative).

Le *Trifolium* est l'un des genres les plus importants de la famille des légumineuses (SABUDAK & GULER., 2009)

Le trèfle d'Alexandrie (*Trifolium alexandrinum L.*), est une espèce du genre *Trifolium* l'un des plus grands genres de la famille des légumineuses, avec environ 255 espèces qui sont bien adaptées à la croissance dans différentes régions agro-écologiques (ZOHARY et HELLER., 1984 ; GILLET et TAYLOR., 2001). Les espèces du genre *Trifolium* ou les trèfles sont d'une importance agricole considérable et sont largement cultivées comme plantes fourragères, des engrais verts et des herbes précieuses dans la médecine populaire de diverses cultures (GILLET et TAYLOR., 2001). Le bersim (*Trifolium alexandrinum L.*) est l'un des fourrages légumineux les plus importants de la région méditerranéenne et du Moyen-Orient (HACKNEY et al., 2007; HANNAWAY et al., 2004; SUTTIE., 1999). Le bersim a été l'une des espèces fourragères qui s'est propagé le plus rapidement ces derniers temps, principalement dans des conditions d'agriculture à petite échelle (SUTTIE., 1999). Il est modérément tolérant à la salinité et peut pousser sur une vaste gamme de sols, bien qu'il préfère les sols fertiles et limoneux aux sols argileux avec un pH légèrement acide à légèrement alcalin (6,5-8) (HACKNEY et al., 2007; HANNAWAY et al., 2004).

Le trèfle blanc est la légumineuse de pâturage la plus importante dans de nombreuses régions du monde, c'est la principale légumineuse cultivée dans les pâturages vivaces à température fraîche, zones de pluie estivale. Le trèfle blanc pousse principalement en conjonction avec les graminées, et est utilisé pour le pâturage, le foin de pâturage et la couverture du sol dans des situations horticoles, où il fournit une riche source de protéines et de minéraux au bétail de pâturage, et fixe de grandes quantités d'azote dans les pâturages, améliorant ainsi la fertilité du sol et réduisant le besoin d'engrais. Alors que le trèfle blanc est considéré comme une plante vivace, il est capable de se comporter comme un annuel dans les climats chauds ou dans des conditions de stress hydrique (ARCHER & ROBINSON., 1989).

L'objectif de ce travail est d'étudier les réponses biochimiques plus que physiologiques de ces deux légumineuses stressées à la salinité, et ce afin d'évaluer leurs réponses à la bio-fertilisation.

Ce mémoire est structuré en un premier chapitre de synthèse bibliographique, puis un deuxième chapitre mettant relief les matériels et méthodes, un troisième chapitre présentant les résultats obtenus suivis des interprétations, traitant les discussions et la conclusion.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Généralité sur le stress et la salinité chez les végétaux

I.1. Définition d'un stress

LEVITT (1980) décrit la physiologie du stress en l'abordant dans son aspect physique. Le stress est une contrainte qui peut se résumer à une (ou plusieurs) forces de déformation appliquées à un corps. Par analogie à la physiologie des plantes, une contrainte environnementale va provoquer une tension interne dans l'organisme exposé.

On appelle stress toute pression dominante exercée par un paramètre, perturbant le fonctionnement habituel de la plante. Par ailleurs, la réponse du végétal dépend, entre autre, de ces paramètres environnementaux, (le type de contrainte, son intensité et sa durée) et génétiques (espèce et génotype) (HOPKINS., 2003).

On distingue deux grandes catégories de stress:

- **Stress biotique:** imposé par d'autres organismes vivants (des micro-organismes, insectes, herbivores,....)
- **Stress abiotique:** provoqué par un défaut ou excès de l'environnement physico-chimique comme la sécheresse, les températures extrêmes, la salinité.

I.2. Définition de la salinité

Selon MERMOUD ; (2006), la salinité est le processus d'accumulation des sels à la surface du sol et dans la zone racinaire qui occasionne des effets nocifs sur les végétaux et le sol ; il s'en suit une diminution des rendements et, à terme, une stérilisation du sol. D'après (BOUCHAR., 2010), la salinité est considérée comme étant la quantité de sels secs dissous dans l'eau. Elle est donnée en partie par milliers notée aussi ‰ ou *psu* (*practical salinity unit*). 1 PSU correspond à 1 gramme de sel sec par kilogramme d'eau. La salinisation est l'accumulation de sels hydrosolubles dans le sol. Ces sels sont le potassium (K^+), le magnésium (Mg^{2+}), le calcium (Ca^{2+}), le chlorure (Cl^-), le sulfate (SO_4^{2-}), le carbonate (CO_3^{2-}), le bicarbonate (HCO_3^-) et le sodium (Na^+). Tout d'abord, la salinisation implique une accumulation de sel par des processus naturels du fait d'une forte teneur en sel du matériau parent ou des nappes souterraines. En second lieu, la salinisation est provoquée par des interventions

humaines, telles que des pratiques d'irrigation inappropriées, par exemple avec de l'eau d'irrigation riche en sel et/ou par un drainage insuffisant. On définit en général deux types de salinité : la salinité primaire et la salinité secondaire. La première résulte de la présence initiale de sels dans le sol ou dans la nappe phréatique. La seconde résulte des apports de l'eau d'irrigation (FARISSI et *al.*, 2014). Des concentrations élevées en sel dans la rhizosphère provoquent un stress du fait du déficit en eau et de la toxicité des ions. En fait, le terme de stress salin s'applique surtout à un excès d'ions, en particulier, mais pas exclusivement, aux ions Na⁺ et Cl⁻ (HOPKINS., 2003).

I.3. Effet de la salinité sur les plantes

Le stress salin a un triple effet:

- il réduit le potentiel hydrique ;
- cause un déséquilibre ionique ou des perturbations en homéostasie ionique ;
- et provoque une toxicité ionique.

Cet état altéré conduit à une croissance réduite et limitation de la productivité végétale (HAYACHI et MURATA., 1998 in PARIDA et DAS., 2005), un arrêt de la croissance peut survenir suite à cette concentration des sels solubles ou au potentiel osmotique de l'eau du sol (GREENWAY et MUNNS., 1980 in PARIDA et DAS., 2005).

I.3.1. Effet de la salinité sur le cycle de l'eau dans la plante

Dans un milieu salin la plante rencontre plusieurs difficultés, la première est d'assurer son approvisionnement en eau. Pour cela, il faut que la plante puisse ajuster la pression osmotique de ses tissus par rapport à la pression osmotique du sol. Ce phénomène nommé l'épictèse, permet donc à la plante d'assurer une hypertonie constante (HELLER., 2004).

Le potentiel hydrique et le potentiel osmotique des plantes deviennent de plus en plus négatifs avec l'augmentation de la salinité ainsi que la pression de la turgescence. Dans les conditions de concentrations élevées de salinité accrue, le

potentiel hydrique de la feuille et la vitesse d'évaporation diminuent significativement chez l'halophyte *Suaeda salsa* alors qu'il n'y a pas de changement dans le contenu relatif en eau (LEUT et *al.*, 2002 in PARID et DAS., 2005).

I.3.2. Effet de la salinité sur la germination

Le stade plantule est le plus vulnérable dans le cycle de vie de la plante, et c'est la germination qui détermine le temps et le lieu pour que la croissance de la plantule ébauche. Ce stade de germination est souvent limité par la salinité du sol et se montre le plus sensible (SAID et *al.*, 2011).

Face à ce phénomène, certaines plantes telque les glycophytes et les halophytes, adoptent un système de résistance en réduisant le nombre total des graines germées et en accusant un retard dans l'initiation du processus de la germination. Parmi les causes de l'inhibition de la germination en présence de sel, la variation de l'équilibre hormonal a été évoquée (REJILI et *al.*, 2006).

I.3.3. Effet de la salinité sur la croissance et le développement des plantes

La réponse immédiate des plantes face au stress salin est la réduction de la vitesse de l'expansion de la surface foliaire et cette expansion s'arrête si la concentration du sel augmente (WANG et NIL., 2000). Le stress salin résulte aussi dans la diminution de la biomasse sèche et fraîche des feuilles, tiges et racines (CHARTZOULAKIS et KLAPAKI., 2000).

La salinité accrue est accompagnée par une réduction significative dans la biomasse racinaire, la hauteur de la plante, le nombre des feuilles par plante, la longueur des racines et la surface racinaire chez la tomate (MOHAMED et *al.*, 1998).

Le taux élevé de NaCl se manifeste par une croissance dans la biomasse des racines, tiges et feuilles et une augmentation dans le ratio partie racinaire/ partie aérienne chez le coton (MELONI et *al.*, 2001).

I.3.4. Effet de la salinité sur le comportement biochimique de la plante

Dans des conditions salines, il y a un changement dans le modèle d'expression des gènes et des changements qualitatifs et quantitatifs dans la protéosynthèse

(REYNOLDS et *al.*, 2001). Le stress salin induit une perturbation de la composition lipidique et protéique au niveau de la membrane cellulaire, affectant ainsi sa stabilité (ALEM et AMRI., 2005).

Chez diverses espèces, plus ou moins résistantes, on a observé une augmentation des sucres totaux résultant d'un blocage de la glycolyse ou du saccharose provenant d'une forte hydrolyse de l'amidon (ASLOUM., 1990). Selon HADJADJ (2009), l'accumulation des sucres solubles est importante dans les feuilles des plantes stressées.

D'autre part, ASPINAL et PALE (1981) in AGUENRAL (2001), signalent que la proline est l'acide aminé le plus caractérisé des plantes soumises au stress salin. L'importance de la proline comme indicateur aux agressions semble jouer un rôle dans le maintien des pressions sol-vacuole, mais aussi dans la protection des membranes et des systèmes enzymatiques, ainsi qu'un régulateur du pH (ALEM et AMERI., 2005).

I.3.5. Effet de la salinité sur le métabolisme de l'azote

L'activité du nitrate réductase (NRA) diminue dans les feuilles de beaucoup de plantes pendant le stress salin (FLORES et *al.*, 2000).

La première cause de la réduction de la NRA dans les feuilles est un effet spécifique associé à la présence de sel Cl^- dans le milieu externe. Cet effet de Cl^- semble être dû à la réduction de l'absorption du NO_3^- et par conséquent une concentration réduite de NO_3^- dans les feuilles, bien que l'effet direct du Cl^- sur l'activité de l'enzyme qui ne peut être écarté (FLORES et *al.*, 2000).

Chez le maïs (*Zea mays*) le taux des nitrates diminue dans les feuilles, mais augmente dans les racines sous le stress salin et la NRA des feuilles diminue aussi dans la salinité (ABDELBAKI et *al.*, 2000).

L'exposition des racines nodulées au NaCl des légumineuses comme le soja et l'haricot cause une réduction rapide de la croissance végétale (PARIDA et DAS., 2005). L'activité de la nitrogénase diminue chez l'haricot par une exposition à courte durée à la salinité.

I.3.6. Effet de la salinité sur les processus physiologiques de la plante

Si la concentration en sel excède le niveau de tolérance de la plante, des perturbations fonctionnelles apparaissent au niveau de la photosynthèse, par effet du sel dans le stroma des chloroplastes qui perturbe le transport des électrons. Par conséquent, la glycolyse et le cycle Krebs sont aussi affectés. De même que l'acquisition de nutriments minéraux comme le potassium, les nitrates ou le calcium est également réduite (ALEM et AMERI., 2005).

Chez certaines halophytes, la croissance est stimulée par un apport modéré de sel, ce phénomène reste limité par un niveau de tolérance. Des stress extrêmes conduisent au nanisme et à l'inhibition de la croissance. Les feuilles deviennent sclérosées avant même d'avoir fini leur croissance, et l'organisme tout entier risque de dépérir assez vite (HOPKINS., 2003).

I.3.7. L'effet osmotique

Plus la salinité augmente et plus la pression osmotique de la solution du sol sera élevée, (BOLYN., 1975). Sur les plantes, la salinité a deux actions bien distinctes qui peuvent se produire simultanément:

- La sécheresse physiologique qui inhibe l'absorption de l'eau et de sels par les plantes et qui entraîne un retard ou un arrêt de croissance (HOPKINS., 2003).
- L'intoxication par la concentration de certains ions provoquant la mort des cellules, la modification des chloroplastes et des mitochondries des feuilles.

Les effets toxiques peuvent se produire sur la membrane plasmique ou dans le protoplaste après avoir traversé celle-ci, notamment le Cl^- et Na^+ (ALEM et AMERI., 2005).

I.3.8. Effet de la salinité sur les pigments photosynthétiques

L'effet de la salinité sur la photosynthèse, dépend de la concentration des sels de la plante, (OMMAMIE., 2005). La salinité réduit l'assimilation de CO_2 par des réductions de surface des feuilles (MUNNS *et al.*, 2000), conductibilité des stomates (PARIDA *et al.*, 2003), efficacité des enzymes photosynthétiques et le bon fonctionnement de photosystèmes (REDONDO-GOMEZ *et al.*, 2008).

Le taux de la chlorophylle et des caroténoïdes des feuilles diminue en général sous les conditions de stress salin. Les feuilles les plus âgées commencent à développer une chlorose et finissent par tomber sous l'effet du stress salin (AGASTIAN et *al.*, 2000).

Par contre Wang et Nil (2000) ont rapporté que la chlorophylle augmente sous les conditions de salinité chez *Amaranthus*. Chez *Grevilea*, la chlorophylle et les caroténoïdes diminuent significativement sous le stress salin, mais les pigments anthocyaniques augmentent significativement dans ce cas de stress salin (PARIDA et DAS., 2005).

I.3.9. Effet de la salinité sur la morphologie des plantes

La salinité affecte toute la plante mais elle freine davantage la croissance des parties aériennes que celle des racines.

I.3.9.1. Effet de la salinité sur les racines

Selon LEVIGNERON et *al.*,(1995), les racines sont les premières à réagir. Selon BRUN en 1980, l'excès de sel dans l'environnement racinaire donne naissance à des plantes naines. La masse racinaire est moins affectée par la salinité que les limbes, les tiges et les pétioles.

I.3.9.2. Effet de la salinité sur les tiges

La longueur des tiges est réduite par l'excès de sel dans le sol (ABERKANE., 1992). Pour le Tournesol, la réduction de la hauteur de la tige est de 30 cm (BOUZAIDI et SALAMA., 1978).

I.3.9.3. Effet de la salinité sur les feuilles

Des concentrations élevées de sels tels que la Ca^{++} , Mg^{++} et les bicarbonates provoquent des nécroses sur les feuilles, des décolorations et la réduction de la chlorophylle (SAIDOUNE., 2000).

I.4. Conséquences de la salinité sur la croissance et le développement de la plante

La salinité excessive affecte la rhizosphère et limite la répartition des plantes dans leur habitat naturel (DENDEN *et al.*, 2005). Elle affecte la croissance des plantes. Les sels dans les sols sont principalement composés de NaCl, mais aussi de calcium, magnésium, carbonate, bicarbonates, sulfates et d'autres ions. Ces ions sont toxiques pour la plupart des plantes à haute concentration. Le sel peut aussi inhiber la capacité des plantes à capter l'eau du sol (ENITA., 2000). La salinité constitue une contrainte importante dans de nombreuses régions du monde et limite sévèrement la fixation symbiotique de l'azote. En effet, la salinité agit sur la survie et la prolifération des rhizobies au niveau du sol et la rhizosphère, inhibe le processus d'infection et affecte directement le fonctionnement des nodules au niveau des racines, affectant ainsi la croissance des plantes, la photosynthèse et la demande en azote, et par suite la productivité et le rendement. En conséquence, les agriculteurs apportent de grandes quantités d'azote pour stimuler cette croissance, ce qui est en contradiction avec les propriétés biologiques des légumineuses et est néfaste pour l'économie des exploitations à revenu limité, ainsi que sur l'environnement en contribuant à la pollution de la nappe phréatique par les nitrates (FARISSI *et al.*, 2014).

II. Les légumineuses

II.1. Généralités

La famille des légumineuses à graines est connue sous le nom *Fabaceae*, également dénommée *leguminosae* (JEZIERNY *et al.*, 2010). C'est la famille la plus importante des dicotylédones (Figure 1). Elles constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun est d'avoir un ovaire libre, constitué par seul carpelle qui donne un fruit appelé gousse ou légume. On compte 475 genres et environ 16400 espèces se répartissant en trois familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae* (ou Fabacées) (COME *et al.*, 2006).

On y trouve des arbres, la plupart exotiques, voire des lianes, mais surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles (GUIGNARD *et al.*, 2004).

Beaucoup d'espèces sont cultivées pour leurs graines qui sont riches en amidon (Fève, Haricot, Lentille, Pois, Pois chiche), en huile (Arachide, Soja) ou en protéines

(Fenugrec, Lupin, Soja) les trèfles, les luzernes, le sainfoin et le lotie servant à l'alimentation du bétail (COME *et al.*, 2006).

Les légumineuses entretiennent une relation très privilégiée avec la rhizosphère qui entoure leurs racines (WALIGORA *et al.*, 2008). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000).

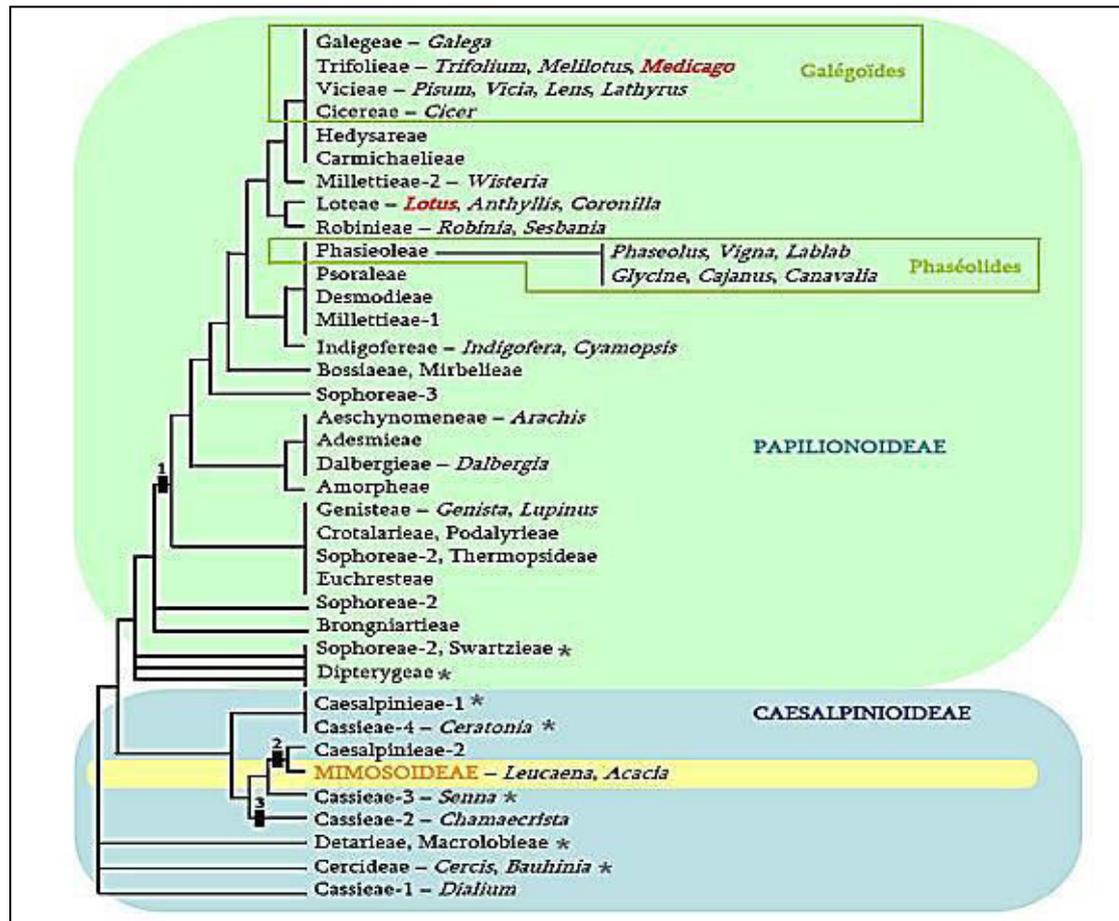


Figure 1: Classification phylogénétique des Légumineuses (DOYLE *et al.*, 1998)

II.2. Principales caractéristiques des légumineuses

Les légumineuses à graines sont cultivées surtout pour leurs graines qui sont récoltées à maturité, et qui sont riches en protéines et en énergie. Les graines mures sèches de légumineuses sont utilisées soit comme ingrédients des aliments pour animaux soit pour la consommation humaine (JEZIERNY *et al.*, 2010).

Les graines des légumineuses occupent une place importante dans l'alimentation humaine (TROSZYNSKA *et al.*, 2002). Les légumineuses alimentaires constituent une source très importante de protéines végétales qui peuvent remplacer le déficit en protéines animales (BEN MBAREK *et al.*, 2009). Des polysaccharides (fibres, amidon), et des micronutriments (vitamines, traces minérales). Les légumineuses sont aussi riches en composés non nutritifs (phytochimiques) (TROSZYNSKA *et al.*, 2002).

L'azote est essentiel à la croissance des végétaux, notamment pour la synthèse des acides nucléiques et des protéines (DUC *et al.*, 2010).

La plus grande partie de l'azote de la biosphère (79%) se trouve dans l'atmosphère. Mais, seul un nombre réduit de genres bactériens vivant librement ou en symbiose avec les plantes sont capables de réduire l'azote moléculaire de l'atmosphère (BADO., 2002).

Les légumineuses ou fabacées se caractérisent par leur capacité naturelle à fixer l'azote de l'atmosphère. Cette aptitude leur est conférée par les bactéries rhizobium (biovar *Viciae*, biovar *Phaseolus*) vivant en symbiose au niveau de leurs racines dans des organes appelés nodosités (DEQUIEDT., 2012).

La ressource énergétique carbonée nécessaire à cette réaction ainsi qu'à la vie de la bactérie est fournie par la plante. On parle de relation symbiotique (DUC *et al.*, 2010).

II.3. Les légumineuses en Algérie

Quoique sur les 237.806.000 hectares, seulement 3,3% sont à vocation agricole, l'Algérie ne demeure pas moins un pays de contrastes, se distinguant par une variation éco-géographique très remarquée. Le désert occupe les 4/5 du pays et le 1/5 restant est largement occupé par les étages bioclimatiques arides et semi-aride. Les étages subhumide et humide couvrent des surfaces relativement plus restreintes. Cette variation des milieux s'accompagne d'une importante diversité de la faune et de la flore.

Dans la flore algérienne, les Fabaceae sont représentées par environ 360 espèces et sousespèces, dont 41 % rares à très rares et 13 % endémiques au sens large (QUÉZEL et SANTA., 1962).

En Algérie, les légumineuses alimentaires (légumes secs) font partie du paysage agricole depuis des millénaires. Ces cultures constituent une importante source protéique susceptible de remplacer les protéines animales difficilement accessibles pour une large couche de la population. Les espèces cultivées sont prioritairement celles à destination humaine et correspondent à la fève, la féverole, le pois chiche, le pois, la lentille et le haricot (ABDELGUERFI-Laouar *et al.*, 2001).

La place des légumineuses alimentaires dans le système agraire n'a pas toujours été importante. Leur superficie totale entre 1993-2002 avoisine 82301 hectares. Les espèces les plus cultivées sont dans l'ordre d'importance : la fève et la féverole, le pois chiche et le pois sec. Les rendements moyens enregistrés pour ces trois espèces sont très bas. Cette situation est le moins qu'on puisse dire alarmante en comparaison avec les normes internationales qui préconisent pour les légumineuses un pourcentage des emblavures par rapport aux céréales. Malheureusement, la production Algérienne est insuffisante : environ 50-80% des besoins nationaux sont importés (en 2003) (FELIACHI., 2002). Or, dans les années 70, l'Algérie couvrait ses besoins en production de légumineuses alimentaires. D'après la littérature et selon des agriculteurs et des hommes de terrain, des variétés et des variétés-populations très diversifiées existaient et étaient spécifiques à certaines régions de l'Algérie (LAUMONT et CHEVASSUS., 1956-1960).

Tableau 1: Légumineuses alimentaires cultivées en Algérie: leur importance en superficie, production et rendement (M.A. 1993-2002).

Culture	Superficie		Production		Rendement (qx/Ha)
	Hectare	%	Quintaux	%	
Fève/Février	40229	48,96	207042	50,27	5,13
Pois chiche	30487	37,04	161799	39,28	5,30
pois sec	8627	10,48	29793	7,23	3,45
Lentilles	1271	1,54	5021	1,22	3,95
Haricot sec	1240	1,50	6480	1,57	5,22
Gesse	377	0,46	1732	0,42	4,59
Total	82301	100	411867	100	5,00

L'Algérie porte une grande richesse d'espèces spontanées fourragères et pastorales, appartenant aux genres *Medicago*, *Scorpiurus*, *Lolium*, *Trifolium*, *Bromus*, *Lotus*, *Hedysarum*, *Phalaris*, et *Dactylis* (LAPEYRONIE., 1978).

Les espèces spontanées apparentées des espèces fourragères (graminées et légumineuses) généralement rencontrées comprennent la luzerne (*Medicago sativa*), des *Medicago* annuelles, le lupin, le bersim, le trèfle, le trèfle blanc, le trèfle souterrain, le pois fourrager (*Lathyrus* ssp), le sulla (*Hedysarum coronarium*), des vesces, des graminées (*Eragrostis*, *Festuca*, *Phalaris*) et diverses espèces comme l'Astragalus, le Bituminaria, le Lotus, et l'Ononis.

Sur les 8 millions d'hectares de SAU, les fourrages ne présentent qu'un faible pourcentage (6%) (M.A., 2005). Les fourrages cultivés occupent 1,6% de la superficie totale (Tableau 2).

Tableau 2: Répartition des surfaces (10³ha) consacrées aux fourrages en Algérie (HOUMANI., 1999).

Etage bio-climatique	Fourrage				
	cultivés	Pacage	Jachère	Prairie	Total
Humide	60,5	269,2	198,9	11,7	540,3
%	11,6	0,9	5,6	38,7	1,6
Sub-Humide	339,9	1310,3	1587,2	16,3	3254,4
%	65,0	4,5	44,8	53,9	9,8
Semi-Aride	118,6	4540,5	1690,9	2,2	6352,2
%	22,7	15,6	47,7	7,4	19,1
Aride	3,7	23358,6	65,4	0,0	23127,7
%	7,0	79,0	1,8	0,0	69,5

II.4. Le genre *Trifolium* L.

Le genre *Trifolium* L. est l'un des plus grands genres de la famille des légumineuses, avec environ 255 espèces qui sont bien adaptées à la croissance dans différentes régions agroécologiques (ZOHARY et HELLER., 1984 ; GILLET et TAYLOR., 2001). Les espèces du genre *Trifolium* ou les trèfles sont d'une importance agricole considérable et sont largement cultivées comme plantes fourragères, des engrais verts et des herbes précieuses dans la médecine populaire de diverses cultures. Au moins 16 espèces (*T. pratense* L., *T. repens* L., *T. resupinatum* L., *T. incarnatum* L., *T. hybridum* L., *T. pannonicum* Jacq., *T. subterraneum* L., *T. fragiferum* L. et *T. medium* L...), sont activement cultivées (GILLET et TAYLOR., 2001), un assez grand nombre pour un seul genre. Les espèces introduites sont devenues largement naturalisées dans le monde entier et de nombreuses espèces indigènes sont également fortement utilisées pour les pasturages (CRAMPTON., 1985). Les nodules racinaires fixateurs d'azote ont été rapportés chez plus de 125 espèces de trèfle (SPRENT., 2001). Parmi les espèces qui ont été étudiées, la nodulation est établie par la micro-symbiote *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* (SPRENT., 2001).

II.4.1. Taxonomie et Génétique

Le genre *Trifolium* est accompagné par une diversification des structures liées à la dispersion des graines, les fruits du trèfle sont assez invariables, mais la corolle et le calice sont plus variables et responsables de la diversité des mécanismes de dispersion (ZOHARY., 1972).

Dans une classification des espèces en fonction de la morphologie, les taxons ont été divisés en 8 sections (ZOHARY et HELLER., 1984). Ces sections ont été nommées : *Lotoidea*, *Paramesus* (C.PRESL), *Mystillus* (C.PRESL), *Vesicaria*, *Chronosemium*, *Trifolium*, *Tricocephalum* Koch et *Involucrarium* Hooker. Six sections sur ces 8 ont été limitées à l'Ancien Monde ou l'Eurasie et certaines s'étendent à l'Afrique (Tableau 4). Seule la section *Involucrarium* a été distribuée dans le Nouveau Monde, dans le Nord et le sud d'Amérique (ZOHARY et HELLER., 1984 ; STEINER *et al.*, 1997).

ELLISON *et al.*, (2006), dans une analyse phylogénétique basée sur l'ADN, ont proposé d'élever la section *Chronosemium* à un sous-genre. Suite à cette classification, les autres espèces de *Trifolium* sont placées dans le sous-genre *Trifolium*, qui est classifié lui-même en huit sections (Tableau 3).

Tableau 3: Classification du genre *Trifolium* proposée par ELLISON et al., (2006) comparée à celle de ZOHARY et HELLER., (1984).

Classification de ELLISON et al., (2006)	Classification de ZOHARY et HELLER., (1984)	Distribution Native	Nombre d'espèces
Sous-genre <i>Chronosemium</i> (Ser.) Reichenb.	Sect. <i>Chronosemium</i>	Région Méditerranéenne	20
Sous-genre <i>Trifolium</i> sect. <i>Glycyrrhizum</i> Bertol.	T. <i>alpinum</i> and T. <i>Polyphyllum</i> de la sect.	Alpes Européens —Caucase Mts.	2
<i>Lotoidea</i>			
sect. <i>Paramesus</i> (C. Presl) BERCHTOLD and J. PRESL	sect. <i>Paramesus</i>	Région Méditerranéenne	2
sect. <i>Lupinaster</i> (Fabricius) Ser.	T. <i>eximium</i> , T. <i>gordejevii</i> et T. <i>lupinaster</i> de la sect.	Est de l'Europe—Siberie	3
<i>Lotoidea</i>			
sect. <i>Trifolium</i>	sect. <i>Trifolium</i>	Region Méditerranéenne Sud de l'Afrique (1)	73
sect. <i>Trichocephalum</i> Koch	sect. <i>Trichocephalum</i>	Region Méditerranéenne	9
sect. <i>Vesicastrum</i> Ser.	sects. <i>Mistyllus</i> , <i>Vesicaria</i> , et une partie de la sect.	Region Méditerranéenne L'Afrique subsaharienne, Madagascar (1)	54
<i>Lotoidea</i>			
sect. <i>Trifoliastrum</i> S.F. Gray	une partie de la sect. <i>Lotoidea</i>	Region Méditerranéenne	20
sect. <i>Involucrarium</i> Hooker	une partie de la sect. <i>Lotoidea</i>	Amerique du sud et Amerique du nord	72

II.4.2. Origine et aire de Répartition

La distribution native de *Trifolium* (Figure 2, Tableau 3) englobe les régions tempérées et, dans une moindre étendue, les régions subtropicales des hémisphères Nord et Sud. Il est particulièrement fréquent dans l'hémisphère Nord. Les principaux centres se trouvent en Eurasie (150-160 espèces), en Amérique du Nord (60-65 espèces) et en Afrique (25-30 espèces) (ZOHARY et HELLER., 1984). Les espèces de *Trifolium* se produisent dans un large éventail d'habitats, y compris les pâturages, les prairies, les forêts ouvertes, les régions semi-désertiques, les montagnes et les sommets des Alpes. Une caractéristique commune de ces habitats divers est la haute radiation solaire ; peu d'espèces de trèfle tolèrent l'ombre (ELLISON *et al.*, 2006).

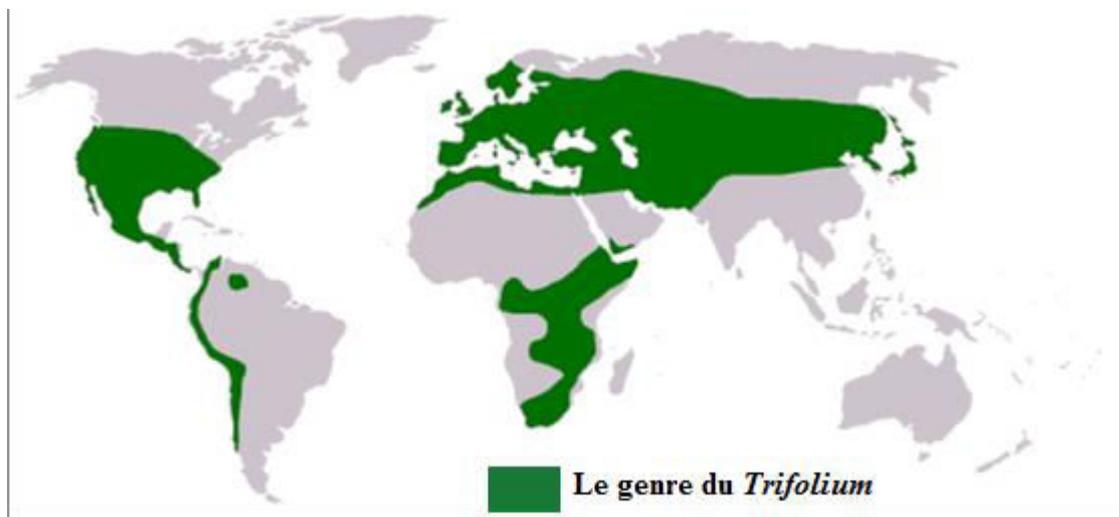


Figure 2: Distribution géographique du genre *Trifolium*

Le bassin méditerranéen, le Nord-ouest de l'Amérique et les hauts plateaux de l'Est d'Afrique sont les trois régions géographiques qui présentent la plus grande diversité des espèces du genre *Trifolium* (ZOHARY et HELLER., 1984). Des travaux récents soutiennent l'origine méditerranéenne du genre dans la période du Miocène précoce (ELLISON *et al.*, 2006). Les trèfles autochtones sont absents dans le Sud-est de l'Asie et en Australie.

II.4.3. Description botanique

Toutes les espèces sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces. Souvent prostrées et rarement de plus de 50 cm de hauteur. En général, les espèces annuelles sont auto-fertiles et les plantes vivaces auto-incompatibles. Le nom du

genre vient du latin Tri = « Trois » et folium = « feuille », et fait référence aux feuilles distinctives habituellement composées de trois folioles (trifoliées). Ces folioles sont presque toujours dentées, parfois maculées en leur centre. L'inflorescence comporte de nombreuses fleurs de taille petite à moyenne (environ 0.3- 2.5 cm), groupées en têtes sous forme d'une grappe, et qui ressemble soit à un capitule en boule, soit à un épi. Les pédoncules s'alignant en étages serrés le long de l'extrémité de la tige. Le calice de la fleur compte cinq dents, avec une corolle typique des Fabacées (étendard, ailes et carène), avec des ailes plus longues que la carène et un étendard érigé généralement recourbé vers le haut dans la majorité des espèces. L'androcée est diadelphie (étamines assemblées en deux groupes). Les fruits sont des petites gousses à l'intérieur du calice, contenant de une à quatre graines (ELLISON *et al.*, 2006).

II.5. Caractères généraux des deux espèces étudiées :

II.5.1. *Trifolium alexandrinum L.*

Le bersim (*Trifolium alexandrinum L.*) est l'un des fourrages légumineux les plus importants de la région méditerranéenne et du Moyen-Orient. Le bersim est une légumineuse fourragère annuelle, peu velue, dressée, de 30 à 80 cm de hauteur (HACKNEY *et al.*, 2007; HANNAWAY *et al.*, 2004; SUTTIE., 1999). Le bersim a une petite racine pivotante. Ses tiges sont creuses, ramifiées à la base, avec des feuilles alternées portant des folioles larges de 4 à 5 cm x 2 à 3 cm. Les fleurs sont d'un blanc jaunâtre et forment des capitules denses et elliptiques d'environ 2 cm de diamètre. Les fleurs doivent être pollinisées par les abeilles pour produire des graines. Le fruit est une gousse contenant une seule graine de couleur blanche à rouge violacé (SMOLIAK *et al.*, 2006). Le bersim est une espèce variable qui peut être classée en quatre groupes de cultivars en fonction de leur ramification et de leur productivité subséquente. Très ramification et productive types sont Miscawi et Kahdrawi (HANNAWAY *et COLLI.*, 2004; SUTTIE., 1999).

Le bersim est un fourrage de haute qualité à croissance rapide qui est principalement coupé et nourri sous forme de fourrage coupé en vert. Il est souvent comparé à la luzerne en raison de sa valeur fourragère comparable. Cependant, contrairement à la luzerne, il n'a jamais été signalé qu'elle cause des gonflements. Il est légèrement moins résistant à la sécheresse, mais il est meilleur sur les sols très humides et alcalins. De plus, il peut être semé au début de l'automne et peut donc

fournir de la nourriture avant et pendant les mois les plus froids (SUTTIE., 1999). Il est très productif lorsque les températures augmentent après l'hiver (HANNAWAY et COLL., 2004; SUTTIE, 1999). Les graines sont abondantes dans des conditions favorables. Le bersim peut aussi être transformé en ensilage avec de l'avoine ou être nourri avec de la paille hachée (HANNAWAY et al., 2004; SUTTIE., 1999). Le pâturage est possible, mais moins fréquent que la coupe. Le trèfle de bersim peut aussi être utilisé comme engrais vert (HANNAWAY et al., 2004).



Figure 3: Fleur du trèfle d'alexandrie (*Trifolium alexandrinum* L.)
(<https://alchetron.com/Trifolium-alexandrinum>)

II.5.1.1. Classification

Tableau 4: Classification de l'espèce *Trifolium alexandrinum L.*

Domaine	Biota
Règne	Plantae (HAECKEL., 1866)
Sous-Règne	Viridaeplantae
Infra-Règne	Streptophyta (JOHN, WILLIAMSON & GUIRY., 2011)
Classe	Equisetopsida (C.AGARDH., 1825)
Clade	Tracheophyta (SINNOTT ex Cavalier-SMITH., 1998)
Clade	Spermatophyta
Sous-Classe	Magnoliidae (NOVÁK ex TAKHT., 1967)
Super-Ordre	Rosanae (TAKHT., 1967)
Ordre	Fabales (BROMHEAD., 1838)
Famille	Fabaceae (LINDL., 1836)
Sous-Famille	Papilionoideae (DC., 1825)
Super-Tribu	Robinoids
Genre	Trifolium.L (1753)
Espèce	<i>Trifolium alexandrinum L.</i> (1755) (BOCK B., 2018)

II.5.1.2. Centre d'origine de l'espèce

Le bersim provient probablement de Syrie. Il a été introduite en Égypte au 6e siècle (HANNAWAY et al., 2004), en Inde au 19e siècle et au Pakistan, en Afrique du Sud, aux États-Unis et en Australie au 20e siècle. Il est également cultivé dans certaines régions du Sud de l'Europe et on tente de le cultiver dans des régions plus septentrionales, comme la Bretagne. Le bersim a été l'un des espèces fourragères qui s'est propagé le plus rapidement ces derniers temps, principalement dans des conditions d'agriculture à petite échelle (SUTTIE., 1999). Les superficies cultivées ont atteint 1,3 million d'hectares en 2007 en Égypte (El-NAHRAWY, 2011) et 1,9 million d'hectares en Inde (I.C.A.R., 2012). Le Maroc a adopté le bersim au début du 20e siècle et 50 000 ha ont été cultivés sous irrigation en 2005 (MERABET et al., 2005).

Le bersim est surtout considéré comme une culture d'hiver dans les régions subtropicales, car il pousse bien en hiver doux et se rétablit fortement après la coupe. Il ne pousse pas bien dans des conditions estivales. Il est cultivé à partir de 35°N jusqu'aux tropiques, du niveau de la mer jusqu'à 750 m (1500 m dans le nord-ouest de L'Himalaya) (HANNAWAY et al., 2004; SUTTIE., 1999). Le bersim a une certaine tolérance au gel, jusqu'à -6°C et jusqu'à -15°C pour certains cultivars (SUTTIE., 1999). Il peut pousser dans des zones où les précipitations annuelles varient entre 550 mm et 750 mm. Il peut supporter une certaine sécheresse et de courtes périodes d'engorgement. Il fait mieux que la luzerne dans les sols à forte humidité et est très productive sous irrigation. Il est modérément tolérant à la salinité et peut pousser sur une vaste gamme de sols, bien qu'il préfère les sols fertiles et limoneux aux sols argileux avec un pH légèrement acide à légèrement alcalin (6,5-8) (HACKNEY et al., 2007; HANNAWAY et al., 2004).

II.5.1.3. La gestion du fourrage

Le bersim ne se multiplie par graines et est généralement semé au début de l'automne. Le bersim peut être semé sur un lit de semence conventionnelle ou directe percé. Il peut être semé seul ou en combinaison avec d'autres espèces. Il est mélangé à de l'herbe (raygrass) ou à une céréale d'hiver comme l'avoine pour produire un ensilage de haute qualité. Le bersim peut être intégré dans un système de culture riz-

blé, comme un fourrage d'hiver et de printemps: il est alors semé avant ou juste après la récolte du riz. En Australie, le bersim est semé avec d'autres légumineuses comme le trèfle d'arrowleaf (*Trifolium vesiculosum*), le trèfle persan (*Trifolium resupinatum*) ou le trèfle de balansa (*Trifolium michelianum*). Dans certaines régions, on sème du bersim avec des légumes comme le sarson (*Brassica juncea*) ou des navets (SUTTIE., 1999).

Sous irrigation, le bersim doit être semé plus tôt et irrigué sur une base hebdomadaire au début. De 10 à 15 irrigations sont généralement nécessaires pour la production fourragère (SUTTIE., 1999). Au Maroc, le bersim irrigué a produit de 8 à 10 t DM/ha (BOUNEJMATE., 1997). Les types très ramifiés et productifs tels que Miscawi et Kahdrawi peuvent produire 4-6 boutures par saison alors que Saidi ne peut être coupé que deux fois. Fahl bersim est un cultivar à faible ramification et est plus adapté aux zones sèches (HANNAWAY et al., 2004; SUTTIE., 1999). Le bersim devrait être coupé lorsque les bourgeons basaux sont courts (environ 2 à 4 cm de hauteur) de sorte qu'ils échappent à la coupe, ce qui nuirait à la repousse et au rendement en fourrage (VILLAX., 1963).

- **Pâturage**

Le bersim ne donne pas de bons résultats en pâturage, car le bétail peut endommager ses bourgeons supérieurs. Lorsque le pâturage est prévu dans des pâturages irrigués, il doit commencer avant que le gazon ne soit trop érigé. Le gazon devrait être brouté jusqu'à une hauteur de 5 à 6 cm et la période de repos devrait être d'environ 30 à 40 jours entre les périodes de pâturage (HACKNEY et al., 2007).

- **Fourrage vert**

C'est un fourrage vert de haute qualité. Le bersim devrait être coupé de 50 à 60 jours après la plantation, puis tous les 30 à 40 jours (SUTTIE., 1999). Le rendement le plus élevé en protéines avec un rendement en fibres relativement faible a été obtenu en coupant la plante à une hauteur d'environ 40 cm. Cinq à six boutures peuvent être faites sous irrigation et une ou deux à la fin de la saison fraîche dans les terres sèches (GÖHL., 1982).

- **Foin**

Le bersim ne convient pas bien au foin car ses tiges succulentes ne sèchent pas facilement. Lorsque le bersim est destiné au foin, seule la dernière coupe à ressort doit être utilisée car elle est plus sèche. Il peut aussi être utile de flétrir le bersim sur le terrain, puis de le laisser sécher sur les toits pour en faire du foin (SUTTIE., 1999).

- **Ensilage**

On peut mélanger le bersim avec du maïs haché à 20% pour obtenir un ensilage de haute qualité (SHAUG SUEPETA et al., 2000). Il est possible de faire de l'ensilage avec du bersim et de la mélasse à 5% (GAAFAR et al., 2011).

II.5.1.4. Impact sur l'environnement

- **Amélioration du sol et lutte contre l'érosion**

Le bersim est une légumineuse fixatrice d'azote. Il peut nécessiter l'inoculation de rhizobium à l'extérieur de sa zone d'origine (HaACKNEY et al., 2007). Comme culture d'hiver, il fournit une couverture de sol et prévient l'érosion. Comme engrais vert, le bersim a intercalé avec l'avoine dans une rotation maïs/soja/avoine + le bersim a augmenté le rendement du maïs de 10% et a retourné 43 kg N/ha (GHAFARZADEH., 1997).

- **Le contrôle des mauvaises herbes**

Le bersim semé en mélange avec l'avoine ou le raygrass étouffe les mauvaises herbes pendant l'établissement et repousse après la coupe au moment de la récolte de l'avoine (CLARK., 2008).

II.5.2. Trifolium repens L.

Le trèfle blanc (holllandais) *Trifolium repens L.* est un herbe vivace qui appartient à la famille des légumineuses (Leguminosae Juss.), variété de typicum, à la fois diploïde ($2n = 2x = 16$) et les plantes tétraploïdes ($2n = 4x = 32$) sont connues (PÇTERSONE & BIRKMANE., 1980 ; ZOHARY & HELLER., 1984 ; HOLMS., 1992 ; VOYSEY *et al.*, 1994 ; UVA *et al.*, 1997 ; JANSONE., 2008). Le Trèfle blanc se produit dans le monde entier et est l'une des espèces végétales cultivées dans le

tempéré zone climatique dans les prairies, les cours, les jardins, le long des routes et rues, etc. (ROZE., 2003 ; ROZE., 2007 ; RAVAGNANI *et al.*, 2012).

Le trèfle blanc est une légumineuse dicotylédone qui croît en association et en compétition avec diverses espèces d'herbes. Il existe trois types de trèfle blanc ; le type sauvage (petites feuilles, stolons fins) ; le type hollandicum (feuilles moyennes, stolons épais) et le type giganteum ou ladino (feuilles très larges) (ERITH., 1924).

Le trèfle blanc est utilisé en association avec des graminées (ray-grass, fétuque, dactyle ...). Cette espèce constitue un excellent fourrage qui présente une bonne qualité nutritive, une bonne digestibilité et appétence. En effet, sa matière sèche est constituée de 20 à 30% de composés azotés, de 11% de sucres solubles, de 4 à 7% de lipides, de 6 à 9,5% d'acides organiques (ANDRIEU., 1983) et de minéraux (calcium, magnésium et phosphore) (FRAME et NEWBOULD., 1986). Le trèfle blanc contribue également à la richesse du fourrage et du sol par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à la présence de nodosités en symbiose avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.



Figure 4: Fleur du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.)
(<https://alchetron.com/Trifolium-repens>)

II.5.2.1. Classification

Tableau 5: Classification de l'espèce *Trifolium repens L.*

Domaine	Biota
Règne	Plantae (HAECKEL., 1866)
Sous-Règne	Viridiaeplantae
Infra-Règne	Streptophyta (JOHN, WILLIAMSON & GUIRY., 2011)
Classe	Equisetopsida (C.AGARDH., 1825)
Clade	Tracheophyta (SINNOTT ex Cavalier-SMITH., 1998)
Clade	Spermatophyta
Sous-Classe	Magnoliidae (NOVÁK ex TAKHT., 1967)
Super-Ordre	Rosanae (TAKHT., 1967)
Ordre	Fabales (BROMHEAD., 1838)
Famille	Fabaceae (LINDL., 1836)
Sous-Famille	Papilionoideae (DC., 1825)
Super-Tribu	Robinioids
Genre	Trifolium.L (1753)
Espèce	<i>Trifolium repens L.</i> (1753)
Variété	<i>Trifolium repens var. biasoletii</i> (STEUD. & HOCHST; ASCH. & GRAEBN., 1907)
Variété	<i>Trifolium repens var.</i> (GIGAS CHEVALL., 1827)
Variété	<i>Trifolium repens var.</i> (POZZICOLA BRIQ., 1913)
Variété	<i>Trifolium repens var. repens L.</i> ,(1753) (BOCK B., 2018)

II.5.2.2. Centre d'origine de l'espèce

Le trèfle blanc semble être originaire des régions méditerranéennes (VAVILIOV., 1951, cité par DAVIES et YOUNG., 1967). C'est dans l'Herbarum Tomus de Brunfels (1532), cité par ERITH (1924) qu'apparaissent les premiers essais de classification du trèfle blanc. Pendant plus de deux siècles, il sera dénommé *Trifolium pratense album*. C'est en 1753 que LINNÉ sépare le trèfle blanc du trèfle violet et lui donne le nom de *Trifolium repens*.

On pense que le genre *Trifolium* est originaire de la Méditerranée au début du Miocène, il y a 16-23 millions d'années (ELLISON *et al.*, 2006). Le trèfle blanc est également originaire de la région méditerranéenne de l'Europe et s'est propagé à travers l'Europe et l'Asie occidentale avec des animaux migrateurs avant l'histoire enregistrée. La domestication du trèfle blanc a eu lieu il y a 400 ans aux Pays-Bas et a migré avec les colons européens vers divers continents sur lesquels il est maintenant considéré comme naturalisé (ZEVEN., 1991 ; LANE *et al.*, 1997). Le trèfle blanc a eu tendance à se naturaliser dans les régions tempérées du monde avec plus de 750 mm de précipitations annuelles (JAHUFER *et al.*, 2001). Les principales zones de culture du trèfle blanc dans le monde sont en Europe occidentale, en Amérique du Nord, en Australie et en Nouvelle-Zélande.

II.5.2.3. La gestion du fourrage

Le trèfle blanc est utilisé dans une pelouse mélangée avec des herbes. Il est utilisé pour le pâturage, le foin de pâturage et la couverture du sol dans des situations horticoles. Il est très important dans les industries laitières, de la viande et de la laine, ce qui améliore considérablement les rendements de ces produits (AYRES *et al.*, 2000).

- **Avantages**

Il y a beaucoup d'avantages à utiliser le trèfle blanc dans les pâturages. Il a une valeur nutritive élevée parce qu'il fournit une riche source de protéines et de minéraux, et a un apport volontaire élevé par les animaux de pâturage, ce qui contribue de manière importante à l'approvisionnement alimentaire tout au long de l'année. En outre, il est adaptable à un large éventail de sols et de conditions

environnementales et se combine bien avec de nombreuses herbes vivaces (FRAME., 2003 ; BETTS & AYRES., 2004).

Une caractéristique très souhaitable du trèfle blanc dans les pâturages est sa capacité de fixation de l'azote, un résultat de la relation symbiotique entre le trèfle blanc et la bactérie *Rhizobium trifolii*, résultant en la formation de nodules dans lesquels le Rhizobium fixe l'azote atmosphérique. Les facteurs environnementaux tels que le pH du sol, la lumière, la défoliation, la température, l'état nutritif du sol et le stress hydrique peuvent influencer l'infection par le rhizobium, la nodulation et les processus de fixation de l'azote, ainsi que la croissance de l'hôte et la demande d'azote (CRUSH., 1987).

Plus récemment, le trèfle blanc a été étudié pour son potentiel dans la phytogestion des sols pollués par les métaux. Il a été démontré que des métaux tels que le cadmium, le zinc et le plomb sont pris et s'accumulent dans les racines des plantes. Dans le trèfle blanc, les niveaux du stress oxydatif s'est avéré être contrôlé par la plante (BIDAR *et al.*, 2007).

Le trèfle blanc est une plante précieuse pour la production de miel dans un certain nombre de pays, y compris l'Australie, la Nouvelle-Zélande, la Grande-Bretagne, les parties septentrionales des États-Unis, le Canada et certaines parties de l'Europe (HOWES., 2007). Il a été dit qu'une plus grande quantité de miel est obtenue de cette plante à travers le monde que de toute autre plante individuelle (HOWES., 2007).

- **Inconvénients**

Il y a quelques inconvénients à la culture du taquet blanc. Le trèfle blanc a une persistance et un rendement variables d'une année à l'autre en raison d'une faible sécheresse et d'une mauvaise tolérance à la chaleur, et il faut donc de bonnes précipitations estivales ou une bonne irrigation. Des sols à fertilité moyenne à élevée contenant du phosphore et du soufre sont nécessaires pour obtenir de bons rendements et une gestion soignée du pâturage est nécessaire. Bien que le trèfle blanc améliore la teneur en azote du sol, l'azote produit est moins prévisible que l'épandage d'engrais (FRAME., 2003 ; BETTS & AYRES., 2004).

II.6. L'effet de la salinité sur le trèfle

La contrainte saline s'associe souvent au déficit hydrique pour limiter la production des espèces végétales. Chez les légumineuses, cet effet est d'autant plus perceptible que la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique est très sensible à la contrainte saline (LAUTER *et al.*, 1981). La salinité affecte la multiplication et la survie du rhizobia dans le sol et la rhizosphère (ALEXANDER., 1984), inhibe le processus d'établissement de l'infection rhizobienne, entraînant une diminution du nombre de nodules, réduit leur contenu en lég'hémoglobine (DELGADO *et al.*, 1994), diminue l'activité de la nitrogénase (DELGADO *et al.*, 1993), altère la diffusion intranodulaire de l'oxygène (SERRAJ *et al.*, 1994) et modifie le statut ionique (SERRAJ *et al.*, 1998). Toutefois, la diminution des photosynthétats fournis pour les nodules (BEKKI *et al.*, 1987 ; GEORGIEV. & ATKINS., 1993 ; JEFFREY *et al.*, 1985] et la réduction des substrats fournis pour la respiration des bactéroïdes (DELGADO *et al.*, 1993) constituent la principale limitation de la fixation symbiotique de l'azote sous contrainte saline. Le métabolisme azoté et la synthèse protéique sont également sévèrement affectés par le stress salin, il en résulte un développement anormal des plantes et une diminution du rendement (PESSARAKLI *et al.*, 1989). Il a également été démontré que certains composés notamment les sucres solubles et la proline s'accumulent dans les tissus des plantes cultivées sous stress salin (IRIGOYEN *et al.*, 1992 ; LARHER *et al.*, 1991). Ils seraient impliqués dans des mécanismes d'ajustement osmotique. D'autres molécules azotées comme la glycinebétaine (FLOWERS *et al.*, 1977 ; GERARD *et al.*, 1991 ; GIRIJA *et al.*, 2002) et les polyamines (LE DILY *et al.*, 1991) interviendraient également dans le même sens. À l'échelle cellulaire, la salinité affecte l'ultrastructure des chloroplastes (ACKERSON. & HERBERT., 1981 ; SALAMA *et al.*, 1994) et plus particulièrement celle des granas (BAKER., 1991 ; RAHMAN *et al.*, 2002). Chez le petit pois, le stress salin provoque la perte de l'enveloppe chloroplastique, l'apparition de gouttelettes lipidiques et la dégradation des membranes thylakoïdiennes (OLMOS. & HELLIN., 1996). L'accumulation de grains d'amidon a été également souvent rapportée (KEIPER *et al.*, 1998 ; LOCY *et al.*, 1996 ; SALAMA *et al.*, 1994).

III. Les bio-fertilisants

III.1. Définition

Un bio-fertilisant est simplement une substance qui contient des micro-organismes vivants qui lorsqu'elle est appliquée au sol, une graine ou une surface végétale colonise la surface rhizosphère et favorise la croissance en augmentant l'offre ou la disponibilité de nutriments pour la plante hôte (VESSEY., 2003). Un bio-fertilisant est une forme modernisée de fertilisant organique dans laquelle des microorganismes bénéfiques ont été incorporés (SWATHI., 2010). Selon HARI et PERUMAL., (2010) le bio-fertilisant est le plus souvent désigné sous le nom de souches sélectionnées de microorganismes bénéfiques du sol cultivés en laboratoire et emballés dans des supports appropriés. Dans un sens large, le terme bio-fertilisant peut être utilisé pour inclure toutes les ressources organiques pour la croissance des plantes qui sont rendues sous forme disponible pour l'absorption des plantes par des micro-organismes ou des associations ou interactions végétales (KHORSO et YOUSEF., 2012).

III.2. Différents types

Les bio-fertilisants sont classés en différents types selon le type ou le groupe de microorganismes qu'ils contiennent. Le tableau 6 montre la classification des bio-engrais sur la base des différents types de micro-organismes utilisés. Les différents types de bio-fertilisant comprennent:

- ✓ **Bio-fertilisants fixateurs d'azote (BFA):** Exemples incluent *Rhizobium Spp.*, *Azospirillum Spp.* et les algues bleu-vert; Elles agissent en fixant l'azote atmosphérique et en le transformant en formes organiques (utilisables par les plantes) dans le sol et les nodules racinaires des légumineuses, les mettant ainsi à la disposition des plantes. Les bio-fertilisants fixateurs d'azote sont des biofertilisateurs spécifiques aux cultures (CHOUDHURY et KENNEDY., 2004).
- ✓ **Bio-fertilisant pour la solubilisation du phosphate (BSP):** Les exemples incluent des *Bacillus Spp.*, *Pseudomonas Spp.* et *Aspergillus Spp.* Ceux-ci agissent en solubilisant les formes insolubles du phosphate dans le sol, afin que les plantes puissent les utiliser. Le phosphore présent dans le sol se

présente principalement sous forme de phosphate insoluble qui ne peut être absorbé par les plantes. Cependant, plusieurs bactéries et champignons du sol possèdent la capacité de transformer ces phosphates insolubles en leurs formes solubles. Ces organismes y parviennent en sécrétant des acides organiques qui abaissent le pH du sol et provoquent la dissolution des formes liées de phosphate, ce qui les rend disponibles pour les plantes (GUPTA., 2004).

- ✓ **Biofertilisants mobilisateurs de phosphate (BMP):** Les exemples sont des Mycorhizes. Ils travaillent en récupérant les phosphates des couches de sol et la mobilisation du phosphore insoluble dans le sol où ils sont appliqués. CHANG et YANG., (2009) ont déclaré que le bio-fertilisant solubilisant le phosphore (BSP) agit parfois comme agent de mobilisation du phosphate.
- ✓ **Biofertilisant favorisant la croissance des plantes (PGPB):** Des exemples de rhizobactéries de croissance des plantes sont *Pseudomonas Spp.* etc: ces travaux produisent des hormones et des anti-métabolites qui favorisent la croissance des racines, la décomposition de la matière organique qui aident à la minéralisation du sol, augmentant ainsi la disponibilité des nutriments et améliorant le rendement des cultures (KHORSO et YOUSEF., 2012) (BHATTACHARYYA et JHA., 2012). Les PGPB sont des bio-fertilisants spécifiques à la culture.
- ✓ **Bio-fertilisant pour la solubilisation du potassium (BSK):** Les exemples incluent des *Bacillus Spp.* et *Aspergillus niger*. Le potassium dans le sol se présente principalement sous forme de minéraux silicatés inaccessibles aux plantes. Ces minéraux sont disponibles uniquement lorsqu'ils sont lentement érodés ou solubilisés. Les micro-organismes solubilisants le potassium solubilisent les silicates en produisant des composés organiques, les acides qui provoquent la décomposition des silicates et aide à l'élimination des ions métalliques en les rendant disponibles pour les plantes. Les bio-fertilisants qui solubilisent le potassium sont des bio-fertilisants à large spectre.
- ✓ **Biofertilisants mobilisateurs de potassium (BMK):** Le *Bacillus Spp.* est un exemple de bio-fertilisant qui mobilise le potassium. Ceux-ci agissent en mobilisant les formes inaccessibles de potassium (silicates) dans le sol. Certains bio-fertilisants phosphorés solubilisants tels que *Bacillus Spp.* et *Aspergillus Spp.* mobilisent le potassium et solubilisent également le phosphore.

- ✓ **Bio-fertilisant oxydant le soufre (BOS):** Un exemple de microorganisme oxydant le soufre est *Thiobacillus Spp.* Ceux - ci travaillent en oxydant le soufre en sulfates qui sont utilisables par les plantes.

Tableau 6: Différents micro-organismes utilisés dans la Production de bio-fertilisant.

Groupes	Exemples
Bio-fertilisants fixateurs d'azote	
Free-living	<i>Azotobacter, Beijerinckia, Clostridium, Klebsiella, Anabaena, Nostoc</i>
Symbiose	<i>Rhizobium, Frankia, Anabaena, Azollae</i>
Association symbiose	<i>Azospirillum</i>
Bio-fertilisant pour la solubilisation du phosphate	
Bactéries	<i>Bacillus megaterium var, Phosphaticum, Bacillus subtilis, Bacillus circulans</i>
Fungi	<i>Penicillum Spp. Aspergillus awamori</i>
Biofertilisants mobilisateurs de phosphate	
Mycorhizes Arbusculaires	<i>Glomus Spp., Gigaspora Spp., Acaulospora Spp.</i> <i>Scutellospora Spp. and Sclerocystis Spp.</i>
Ectomycorhizes	<i>Laccaria Spp. Pisolithus Spp, Boletus Spp. and Amanita Spp.</i>
Mycorhize éricoïde	<i>Pezizella ericae</i>
mycorhize orchidée	<i>Rhizoctonia solani</i>
Bio-fertilisant pour micro-nutriments	
<i>Bacillus Spp</i>	Silicate et zinc solubilisateurs
PGPR	
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

(RITAIKA et UPTAL., 2014)

III.3. Les bio-fertilisants à base de champignons arbusculaires

Le rôle majeur des CMA est l'amélioration des nutritons hydrique et minérale de la plante grâce à des transferts de l'eau et des éléments minéraux, en particulier le phosphore et l'azote, du CMA vers la plante hôte. Il en résulte une amélioration de la croissance des plantes mycorhizées. En effet, l'élongation des hyphes extra-racinaires augmente la surface de contact entre les minéraux du sol et la racine. De plus, ils peuvent explorer des zones non accessibles pour les plantes non mycorhizées pour y prélever l'eau et les nutriments et les transférer à la plante hôte (KHALVATI et *al.*, 2008).

III.3.1. Transfert du phosphore

La plupart des sols contiennent de grandes quantités de phosphore organique ou inorganique estimées entre 200 et 3000 mg/kg de sol (HARRISON., 1987). La majeure partie du phosphore est le plus souvent sous forme d'orthophosphate inorganique adsorbé aux autres constituants cationiques du sol pour former des complexes CaPO_4 avec le calcium, à pH élevé, et des complexes FePO_4 ou AlPO_4 avec le fer ou l'aluminium, à pH faible, ainsi que sous forme de molécules organiques comme la lécithine (JAVOT et *al.*, 2007 ; SMITH S.E. et SMITH F.A., 2012). De plus contrairement à de nombreux autres nutriments minéraux, le phosphore est très peu mobile dans les sols (JAVOT et *al.*, 2007). Sous l'action du prélèvement racinaire, il se crée rapidement des zones d'appauvrissement autour des racines. Une faible proportion (généralement inférieure à 1%) est immédiatement disponible pour les plantes, qui ont des difficultés à acquérir cet élément alors que leurs besoins sont grands (SMITH S.E. et *al.*, 2011). En effet, le phosphore est un élément indispensable à la vie de la plante. Ce composé entre dans la synthèse de nombreuses molécules telles que l'ATP, les nucléotides monophosphate, les phospholipides, certaines enzymes et co-enzymes (MAATHUIS., 2009). Le phosphore est également stocké dans les vacuoles sous forme d'inositol-hexa-phosphates (phytates) qui sont d'excellents chélateurs des cations tels que le Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} et Zn^{2+} (MITSUHASHI et *al.*, 2005). La formation et l'hydrolyse de liaisons pyrophosphates est un mécanisme central dans la régulation de l'énergie cellulaire (MAATHUIS., 2009).

Ainsi, les plantes ont élaborés diverses stratégies augmentant leur capacité d'absorption du phosphore ou sa disponibilité dans les sols (MARSCHNER., 1995). La première consiste en l'augmentation de l'interface racine/sol afin d'accéder à une plus grande quantité de phosphore directement disponible. La deuxième stratégie consiste pour la plante à libérer le phosphore des complexes formés avec les cations en secrétant des molécules comme le malate ou le citrate qui entrent en compétition avec le phosphore ou encore des phosphatases capables de minéraliser le phosphore des composés organiques (JAVOT et *al.*, 2007). A côté de ces deux stratégies permettant à la plante de prélever directement le phosphore du sol, la méthode de prélèvement du phosphore la plus commune consiste en la voie dite ‘‘mycorhizienne’’, via le mycélium extra-racinaire du CMA (SMITH S.E. et *al.*, 2011). Pour accéder aux pools de phosphore du sol inaccessibles aux plantes, les CMA seraient capables d'hydrolyser le phosphore organique en phosphore inorganique pour le rendre disponible dans le sol à la plante ou encore le transférer directement à la plante hôte (FENG et *al.*, 2002), en échange des glucides provenant de la plante et transférés vers le CMA à travers l'interface mycorhizienne (PARNISKE., 2008; BÜCKING et SHACHAR-HILL., 2005). D'ailleurs, les cellules végétales contenant des structures mycorhiziennes contiennent une quantité de phosphore supérieure aux autres cellules racinaires. Le prélèvement du phosphore par le mycélium extra-racinaire se fait contre un gradient de concentration. Le processus d'absorption étant énergie dépendant, le phosphore entre dans le cytoplasme via des symports $P_i:H^+$ de haute affinité (JAVOT et *al.*, 2007). Trois transporteurs du phosphore ont été identifiés chez les CMA, *GvPT*, *GiPT* et *GmosPT* chez *Glomus versiforme*, *Glomus intraradices* et *Glomus mosseae* respectivement (HARRISON et VAN BUUREN., 1995 ; MALDONADO-MENDOZA et *al.*, 2001 ; BENEDETTO et *al.*, 2005).

III.3.2. Transfert de l'azote

Comme le phosphore, l'azote est un composant vital pour le CMA et la plante. Il entre dans la formation des phospholipides, des coenzymes et des acides aminés. L'azote est présent sous deux formes dans le sol: organique et minérale (nitrites, nitrates et ions ammonium). Le mycélium du CMA est capable de prélever l'azote sous forme d'ions ammonium (NH_4^+), sous forme de nitrates (NO_3^-) (BAGO et *al.*,

1996) et sous forme d'acides aminés (HAWKINS et *al.*, 2000), avec une nette préférence pour les ions NH_4^+ (LOPÉZ-PEDROSA et *al.*, 2006). Il peut également accélérer la dégradation de la matière organique afin d'en augmenter la biodisponibilité pour les plantes. L'acquisition de l'azote nécessite l'activité de transporteurs localisés au niveau de l'interface sol/hyphes extra-racinaires du CMA. Deux gènes codant pour des transporteurs de l'azote ont été identifiés chez les CMA, *GintAMT1* et *GintAMT2* codant pour des transporteurs de haute-affinité aux ions NH_4^+ chez *Glomus intraradices* (LOPÉZ-PEDROSA et *al.*, 2006 ; PÉREZ-TIENDA et *al.*, 2011).

III.3.3. Transfert des oligo-éléments du CMA à la plante

Il est également connu que le CMA permet une meilleure absorption d'oligo-éléments peu mobiles dans les sols, tels que le cuivre, le zinc, le fer, le manganèse et le cobalt. A titre d'exemple, il a été détecté deux fois plus de zinc, fer et manganèse et trois fois plus de cuivre dans des plants d'arachides mycorhizés par *Glomus fasciculatum* par rapport à des plants non mycorhizés (KRISHNA et BAGYARAJ., 1984). Ces oligo-éléments jouent des rôles dans des activités enzymatiques impliquées dans la photosynthèse, la respiration oxydative, la protection contre les radicaux libres ou encore la biosynthèse des lipides (FRAÛSTRO DA SILVA et WILLIAMS., 1991). Plusieurs études ont montré que l'inoculation mycorhizienne améliore la nutrition en zinc et en cuivre chez le pois chiche, le soja, le trèfle et la luzerne (ROSS et HARPER., 1970 ; SCHOENEBERGER et *al.*, 1989). Cependant, lorsque certains de ces éléments sont présents en fortes quantités et possèdent de ce fait un caractère toxique, la mycorhization peut jouer un rôle de protection de la plante, par une forte rétention de ces éléments (LIU et *al.*, 2000).

III.3.4. Les intérêts des CMA dans la résistance des plantes aux stresses biotiques et abiotiques

III.3.4.1. Résistance aux stress biotiques

L'atténuation des dommages causés par certains agents phytopathogènes (champignons oomycètes, bactéries ou nématodes) a été démontrée dans de nombreux travaux chez les racines des plantes mycorhizées par rapport aux non-mycorhizées (St-ARNAUD et *al.*, 1995 ; FILION et *al.*, 1999 ; SINGH et *al.*, 2000; ELSESEN et *al.*,

2003; WHIPPS., 2004 ; LIU *et al.*, 2007). Le potentiel des mycorhizes arbusculaires comme agents de lutte biologique a été répertorié chez des dizaines d'espèces cultivées en association avec plusieurs glomérromycètes pour des infections d'origine principalement fongique et bactérienne. La majorité des études décrites dans la littérature concernent des infections racinaires impliquant des genres : *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora* ou *Verticillium*. Néanmoins, il existe peu de travaux sur le rôle des mycorhizes arbusculaires dans la protection des plantes contre les maladies foliaires (GERNNS *et al.*, 2001 ; FRITZ *et al.*, 2006 ; JUNG *et al.*, 2009 ; MOLLER *et al.*, 2009). Cet effet protecteur dépend des espèces végétales et fongiques et des conditions environnementales. Cette protection apportée par la colonisation mycorhizienne résulterait de cinq mécanismes d'action principaux :

- La stimulation de la croissance de la plante par une meilleure nutrition et la compensation par la symbiose des dommages causés par l'agent phytopathogène (WHIPPS., 2004; DALPÉ., 2005; POZO *et al.*, 2009; WEHNER *et al.*, 2010).
- La compétition directe ou indirecte entre les CMA et les organismes phytopathogènes, liées à la disponibilité des nutriments, et des sites d'infection sur la racine (CORDIER *et al.*, 1998; WHIPPS., 2004; DALPÉ., 2005; POZO *et al.*, 2009; WEHNER *et al.*, 2010). Il a ainsi été montré que *Rhizophagus irregularis* affecte la croissance d'une souche virulente de *Fusarium sambicinum*, un pathogène de la pomme de terre, et induit chez celui-ci la répression de l'expression de gènes de synthèse de mycotoxines (ISMAIL *et al.*, 2011).
- La transformation morphologique et architecturale de la racine qui pourrait altérer la dynamique infectieuse du pathogène (WHIPPS., 2004; DALPÉ., 2005; POZO *et al.*, 2009; WEHNER *et al.*, 2010).
- La modification du microbiome du sol et de l'augmentation du taux de matière organique dans les sols. Ces changements peuvent mener à la stimulation de la production de composés par la microflore avec une activité antagoniste vers certains pathogènes racinaires (BAREA *et al.*, 2005; DALPÉ., 2005; POZO *et al.*, 2009; WEHNER *et al.*, 2010).
- L'induction ou la suppression de certains mécanismes de défense des plantes, au niveau moléculaire et enzymatique (DALPÉ., 2005; POZO et AZCÓN-

AGUILAR., 2007; POZO *et al.*, 2009; WEHNER *et al.*, 2010 ; ISMAIL & HIJRI., 2010 ; GALLOU *et al.*, 2011 ; JUNG *et al.*, 2012).

III.3.4.2. Résistance aux stress abiotiques

De nombreux travaux ont mis en évidence l'effet protecteur des mycorhizes à arbuscules contre divers stress abiotiques, tels que la sécheresse, la salinité et la pollution. La meilleure tolérance des plantes mycorhizées, par rapport aux non mycorhizées, est due à :

- Une meilleure nutrition des plantes, leur permettant une meilleure croissance (EVELIN *et al.*, 2012; HART & FORSYTHE., 2012). Lors d'un stress salin, le CMA peut augmenter l'absorption de potassium par la plante et empêcher la translocation du sodium vers les feuilles (ABDEL LATEF & CHAOXING., 2011; EVELIN *et al.*, 2012). Une plus forte accumulation de potassium par les plantes mycorhizées en condition de stress salin serait bénéfique pour maintenir un rapport K^+/Na important et influencer la balance ionique du cytoplasme ou l'efflux de sodium par les plantes (DAEI *et al.*, 2009; RUIZ-LOZANO *et al.*, 2012).
- Une meilleure nutrition hydrique, liée à une conductivité hydraulique plus importante (KAPOOR *et al.*, 2008); une morphologie différente du système racinaire induite par les CMA (KOTHARI *et al.*, 1990); une conductance au niveau des stomates et une transpiration plus importantes (SHENG *et al.*, 2008); et un ajustement osmotique (ABDEL LATEF & MIRANSARI., 2014).
- Une modification de l'architecture du système racinaire au niveau de : la longueur, le nombre de racines latérales, le diamètre et la densité de branchement (ESPELETA & EISSENSTAT., 1998; BOUKCIM *et al.*, 2001; PASZKOWSKI & BOLLER., 2002; WU *et al.*, 2012).
- Une régulation de la synthèse des polyamines (GOICOCHEA *et al.*, 1998; SANNAZZARO *et al.*, 2007; CICALATELLI *et al.*, 2014). Ces molécules sont essentielles pour la croissance des plantes (BAGNI & TASSONI., 2001), mais jouent également un rôle dans la protections des plantes contre de nombreux stress abiotiques (sécheresse, salinité, températures extrêmes) (RODRÍGUEZ-KESSLER *et al.*, 2006).

- Un ajustement osmotique, grâce notamment à une augmentation des contenus en glucose, fructose, saccharose et proline (SHARIFI *et al.*, 2007; YOOYONGWECH *et al.*, 2013 ; TALAAT & SHAWKY., 2014).
- Une augmentation d'activités enzymatiques antioxydantes (superoxydes dismutases, catalases, peroxidases), protégeant la plante contre le stress oxydant induit par divers stress (salinité, sécheresse, pollution) (DEBIANE *et al.*, 2008, 2009; ZHU *et al.*, 2010; ABDEL LATEF & CHAOXING., 2011).
- La production de glomaline, en plus de stabiliser le sol, la glomaline est capable d'immobiliser des métaux et de réduire ainsi le stress métallique chez les racines mycorhizées (CORNEJO *et al.*, 2008 ; SEGUEL *et al.*, 2013). De plus, des études ont montré une contribution positive de la glomaline dans la tolérance des plantes hôtes à la sécheresse et la salinité (AUGÉ *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2008; HAMMER & RILLIG., 2011).
- L'induction de changements moléculaires. Par exemple, il a été révélé que chaque gène d'aquaporine (canaux à eau) répond différemment à la colonisation mycorhizienne et le stress imposé (sécheresse, froid ou salinité) (OUZIAD *et al.*, 2006 ; AROCA *et al.*, 2007 ; JAHROMI *et al.*, 2008).

Chapitre II

Matériels et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal et fongique

Les expérimentations ont été menées sur deux espèces de Trèfle : *Trifolium alexandrinum* L. et *Trifolium repense* L.

Pour les inoculations par les CMA, deux types d'inoculum ont été utilisés :

1. Un inoculum commercial à base d'un mélange de 6 espèces de CMA à savoir : *Rhizophagus intraradices* BEG140, *Funneliformis mosseae* BEG95, *Glomus etunicatum* BEG92, *Funneliformis claroideum* BEG96, *Glomus microaggregatum* BEG56, *Funneliformis geosporum* BEG199, dépourvu de bio-additives, produit par la compagnie Symbivit ; Inoculum plus (France).

2. Et un inoculum local produit à partir de la multiplication des souches naturelles autochtones de sols salins. le piégeage et la multiplication de l'inoculum mycorhiziens autochtone a duré 18 mois à l'Unité de Chimie Environnementale et Interaction sur le Vivant à Calais en France. Vu que les champignons mycorhiziens à arbuscules sont des symbiotes obligatoire, leur multiplication se fait toujours sur les racines des plantes hôtes, dans cas il s'agit du Trèfle : *Trifolium repens* L. En pratique tous les quatre mois (un cycle de multiplication), La partie aérienne des plantes de Trèfle en culture sont coupées et la partie racinaire est mélangé au substrat avant que le tout ne soit transféré dans des pots plus grand et que de nouvelles graines sont mises en culture. À la fin de la phase de multiplication, l'inoculum obtenu est sous forme de mélange racinaire mycorhizé, d'hyphes mycorhiziennes, de spores et de substrat inerte. Les espèces de CMA identifié dans cet inoculum sont au nombre de huit espèces : *Septoglomus constrictum*, *Funneliformis geosporum*, *F. mosseae*, *F. coronatum*, *F. caledonium*, *Rhizogloium diaphanus*, *Rhizogloium fasciculatus* and *Gigaspora gigantea*.

I.2. Le substrat

Le substrat utilisé dans la réalisation de ces travaux de recherches provient de la région de Djelfa et de Modjbara. Les caractéristiques agro pédologiques et bioclimatiques du site de prélèvement du sol sont présentées dans le tableau 7.

II. Méthodes

II.1. Préparation du substrat de culture

Les sols utilisés pour la plantation des deux espèces de Trèfles sont des sols naturellement salin, l'un provient de la région de Djelfa et le deuxième de Moudjbara présentant un taux de salinité élevé : 2.81 ds.m⁻¹ et 1.84 ds.m⁻¹ respectivement et ce selon la classification de Mathieu et al. (2003) In Madani (2008).

Tableau 7 : Caractéristiques agro pédologiques et bioclimatique du site de prélèvement :

Nom du site	M (°C)	m (°C)	P (mm/an)	Altitude (m)	coordonnées	Q ₃	Étage Bioclimatique
Djelfa	34.11	0.69	319.23	1131	34°40'00''N 3°15'00'' E	43.46	Semi-aride à hiver froid
pH water	CE (ds.m-1)	Salinité (g.l-1)	Humidité (%)	P assimilable (mg.g-1)	N (mg.g-1)	C (mg.g-1)	C/N
7.54	2.95	1.72	8.01	0.11	0.23	13.56	33.56
Na (meq/100g)	MO%	Calcaire total (%)	Calcaire actif (%)	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	Texture
1.35	1.34	12.37	6.15	12	33.35	50.24	Limono-sablo-argileuse
Nom du site	M (°C)	m (°C)	P (mm/an)	Altitude (m)	coordonnées	Q ₃	Étage Bioclimatique
Moudjbara	32.1	0.58	319.23	1131	34° 26'35.0'' N 03° 27'0.6''E	43.46	Semi-aride à hiver froid
pH water	CE (ds.m-1)	Salinité (g.l-1)	Humidité (%)	P assimilable (mg.g-1)	N (mg.g-1)	C (mg.g-1)	C/N
7.54	1.81	1.72	8.12	0.2	0.3	15.56	51.86
Na (meq/100g)	MO%	Calcaire total (%)	Calcaire actif (%)	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	Texture
1.35	2.4	13.65	5.12	5	53.35	41.65	sablo-limoneuse

II.2. Traitement d'inoculation

Des deux types d'inoculum mycorhiziens arbusculaire ont été ajouté au sol à raison de 5g/pot de à raison de 3 réplica par traitement. Le premier inoculum est autochtone produit par multiplication à partir de sol salin durant une période de 24

mois par le trèfle. Le deuxième, un inoculum commercial (Symbivit Inoculum plus, France). De même un témoin sans inoculation a été utilisé afin d'évaluer l'effet de la salinité sur le développement végétatif des plantes hôtes.

II.3. Dispositif expérimental

Les essais ont été conduits dans des pots en plastique (15 cm de profondeur et une capacité de 1 kg). Munis d'un dispositif de drainage adéquat. Tous les pots sont maintenus à des conditions de culture non-contrôlées. Trois traitements différents ont été effectués :

- Plantes témoins (T) : sans apport de mycorhizes ;
- Plantes mycorhizées avec un inoculum commercial (TC) : Symbivit (Inoculum plus) ;
- Plantes mycorhizées avec un inoculum autochtone (TA), produit par piégeage des propagules avec le trèfle sur sol naturellement salin.



Figure 5: Mise en place du dispositif expérimental.

II.4. Estimation des paramètres de croissance

Un contrôle continu des plants est effectué de façon hebdomadaire, la taille des plants, le nombre de feuilles par pot sont notés.

Après 12 semaines de culture, les parties aériennes sont prélevées, la biomasse fraîche évaluée avant de les sécher à 70°C pendant 72h jusqu'à la stabilisation du poids. Trois replicats sont utilisés pour chaque traitement.

II.5. Dosage des protéines totales solubles

Le dosage des protéines se fait selon la technique de Bradford., (1976).

a. Extraction

Prendre 0,1 g de matière végétale avec 1 ml de tampon d'extraction : tampon phosphate 0.06 M PH 7, l'extraction se fait à froid (mortier dans la glace pilée) puis centrifugation à 8000 tours pendant 15 min.

b. Dosage

Prendre 100 µl d'échantillon à doser et ajouter 2 ml de réactif de Bradford (Annexe 2), après 2 min du développement de la réaction, la densité optique est lu à 595 nm.

Pour réaliser un courbe étalon de la protéine soluble, préparer avec une solution mère de BSA (Annexe 7) allant de 0.1 à 1.4 mg.ml⁻¹ et prendre 100 µl de ces derniers, puis ajouter 2 ml du réactif de Bradford, la lecture de la densité optique se fait à la longueur d'onde 595 nm après 2 min du développement de la réaction.



Figure 6: Dosage des protéines totales. **A:** Broyage à froid de la matière végétale avec tampon phosphate 0.06M pH 7. **B :** Centrifugation. **C :** Ajoute 2 ml de réactif de Bradford. **D :** Passage en spectrophotomètre après 2 min du développement des réactions.

II.6. Dosage des éléments minéraux

L'extraction des minéraux de la partie aérienne et racinaire des plants est effectuée à partir de la matière sèche des feuilles broyées.

II.6.1. Dosage du phosphore

Selon la méthode de TAUSKY et SHORR., (1963). Le phosphore est dosé par Colorimétrie. La minéralisation est la première étape réalisée, en utilisant l'acide

chlorhydrique (HCl) (1N) afin de dissoudre toute la matière organique : 0.5 g de chacune des poudres, mélangées avec 25 ml d'HCl dans le broyeur. La solution obtenue est centrifugée pendant 3 min à 3000 tours/min, suivie d'une filtration du surnageant. Après filtration, à chaque échantillon une dose de 2 ml du réactif sulfomolybdique (Annexe 3) et 2 ml d'eau distillée sont ajoutées avant le passage par spectrophotométrie. Une gamme d'étalon est préparée à base de KH_2PO_4 dans les mêmes conditions expérimentales des échantillons dosés.



Figure 7: Dosage du phosphore par colorimètre Selon (TAUSK et SHORR., 1963). **A:** Découpage des feuilles. **B, C et D :** Poids de matière fraîche et sèche à 70 C°/ 72h. **E :** Mettre 0.1g de matière sèche requis et ajoute 5 ml d' HCl. **F :** Après la centrifugation en récupérant le surnageant et filtrage. **G:** Ajoute 2 ml de réactif sulfomolybdique. **H :** Passage en spectrophotomètre à 650 nm.

II.6.2. Dosage des minéraux libres Na^+ , Cl^- et K^+

Une prise d'essai de 100 mg sous forme de poudre végétale de chaque échantillon a été pré-calcinée sur une plaque chauffante et ensuite calcinée dans un four à moufle à une température de 450 °C jusqu'à l'obtention d'une poudre blanchâtre. Celle-ci contient tous les minéraux du végétal. Les échantillons ont été par la suite attaqués à chaud avec l'acide nitrique (HNO_3 0,1 N) pour extraire le phosphore et d'autres éléments minéraux (Mg, Mn, Fe, Cu et Zn) (PAUWELS *et al.*, 1992). Le dosage du potassium et du sodium par un photomètre à flamme.

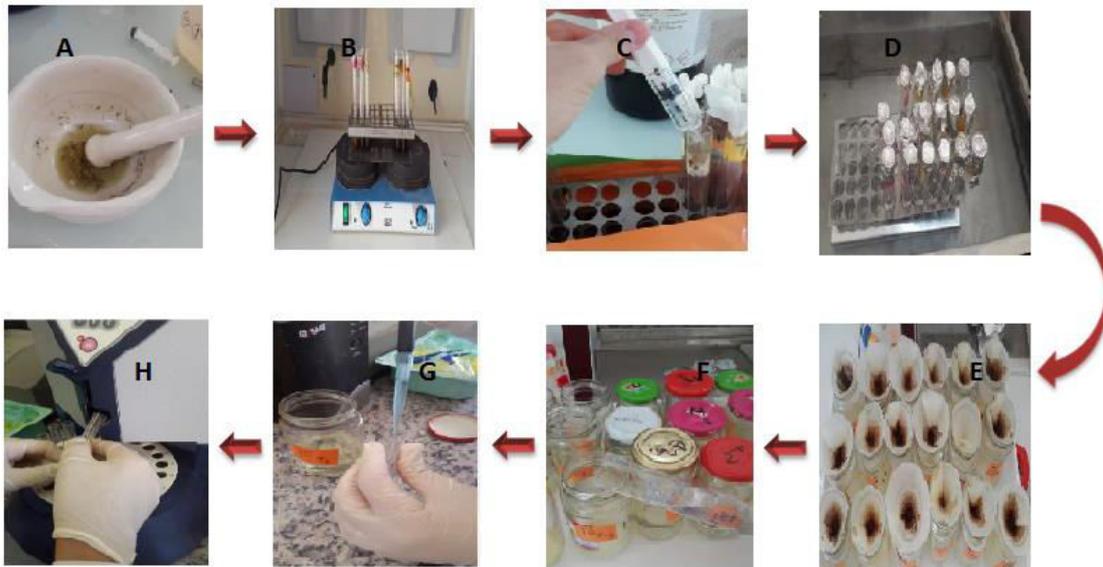


Figure 8: Dosage des éléments minéraux Selon (PAUWELS et *al.*, 1992). **A:** Broyage 0.1g de poudre végétale avec 5 ml HCl. **B:** Evaporation à sec. **C:** Ajoute 3 ml HNO₃ à 10%. **D :** Ébullition 5 min. **E et F:** Filtration et compléter 100 ml d'eau distillée. **G et H:** Passage en photomètre à flamme.

II.7. Dosage de la chlorophylle

On a utilisé pour l'extraction de la chlorophylle la méthode établie par (HOLDEN., 1965). L'extraction de la chlorophylle à l'acétone pure à 90% (Annexe 1) : broyage avec 9ml d'acétone pour 100 mg de matière végétale fraîche, centrifugation à 5000 tr/min pendant 10 à 15 min à 25 C°, jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide. Les caroténoïdes sont détectés en spectrophotométrie à une DO de 750, 660 et 430. L'étalonnage de l'appareil se fait par la solution témoin d'acétone à 90%. Le calcul des valeurs de la chlorophylle se fait grâce à la formule d'ARNON., (1949) :

$$\text{Chl.a} = 12.7 (\text{D.O660}) - 2.69 (\text{D.O750}).$$

$$\text{Chl.b} = 22.9 (\text{D.O660}) - 4.86 (\text{D.O750}).$$

$$\text{Chl.a} + \text{Chl.b} = 8.02 (\text{D.O660}) + 20.20 (\text{D.O750}).$$

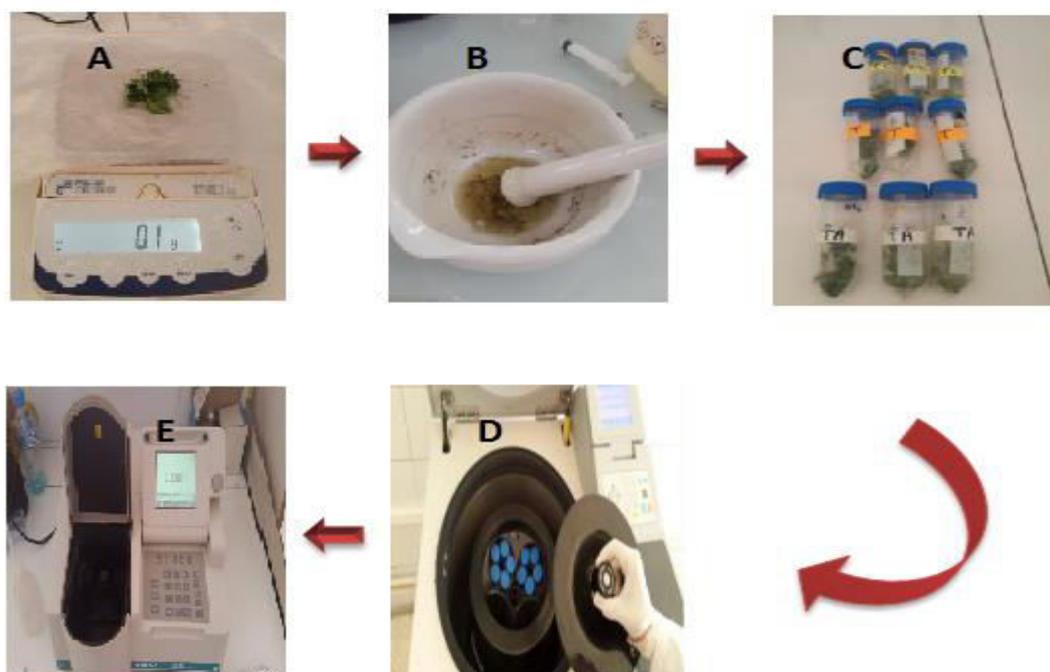


Figure 9: Dosage de chlorophylle. **A:** Mesure de matière fraîche. **B:** Broyage avec acétone pure à 90%. **C** et **D:** Place dans centrifugation. **E:** Passage en spectrophotomètre à 750, 660 et 430 nm.

II.8. Dosage de la proline

Un échantillon représentatif de 2 g de matière végétale fraîche est placé dans un tube à essai contenant 10 ml de méthanol. Les tubes sont conservés dans un bain Marie pendant 30 min, puis refroidi à température ambiante. 2 ml de ninhydrine (Annexe 4) est ajouté au mélange qui est maintenu dans le bain Marie pendant 20 min, puis a été refroidi juste après dans un bain d'eau glacée. Le mélange réactionnel a été extrait avec 2 ml de toluène vigoureusement agité et laissé à température ambiante pendant 30 min jusqu'à la séparation des deux phases. Le chromophore contenant du toluène (1 ml, phase supérieure) était vermifugé à la température ambiante et sa densité optique était mesurée à 520 nm par spectrophotomètre en utilisant du toluène comme solution de calibrage (SADASIVAM et MANICKAM., 1996). La gamme étalon est établie à partir de la proline pure (Annexe 6).

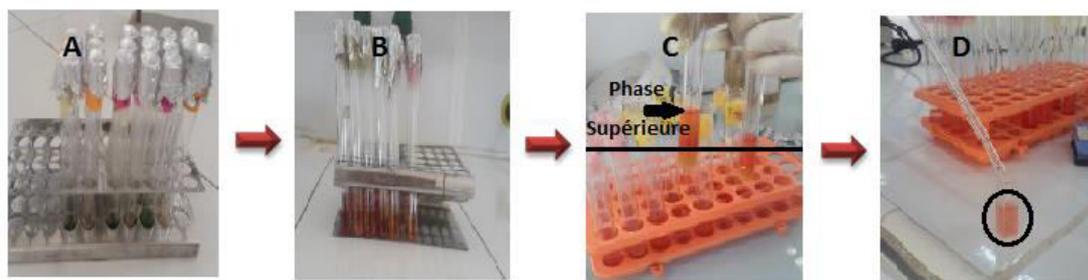


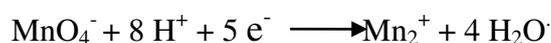
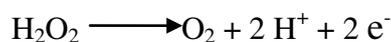
Figure 10: Dosage de la proline. **A:** Echantillon avant chauffage au bain marie. **B:** Echantillon après chauffage au bain marie. **C:** Séparation des deux phases. **D:** Passage la phase supérieure en spectrophotomètre à 520 nm.

II.9. Estimation des activités enzymatiques

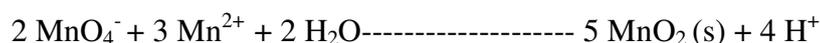
II.9.1. La catalase

100 mg du poids frais foliaire prévenant du même pot ont été utilisés comme répliquas biologique. Le matériel biologique a été broyé et homogénéisé dans 1 ml de tampon phosphate de potassium (100 mM, pH 7.0). Le surnageant est récupéré après centrifugation (12 000xg, 5 min, 4°C) et gardé dans la glace jusqu'au dosage de l'activité.

La catalase est un enzyme permettant la transformation de l'eau oxygénée (H_2O_2) en eau (H_2O) et dioxygène (O_2). Pour mesurer cette activité nous allons mettre l'extrait enzymatique en contact avec de l'eau oxygénée pendant une durée déterminée. Nous évaluerons alors l'activité enzymatique de la catalase en déterminant la quantité restante d'eau oxygénée (UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER., 2010). Pour cela nous effectuerons un dosage au permanganate de potassium (Annexe 5) en milieu acide suivant les réactions suivantes :



L'ion permanganate ainsi obtenu (Mn^{2+}) est de couleur rose. Il permet donc de déterminer l'équilibre au moment du dosage. Cette coloration n'est pas stable car il se suit une autre réaction :



Mais toutefois la coloration reste durent une période de 15 secondes au moment de l'équilibre.

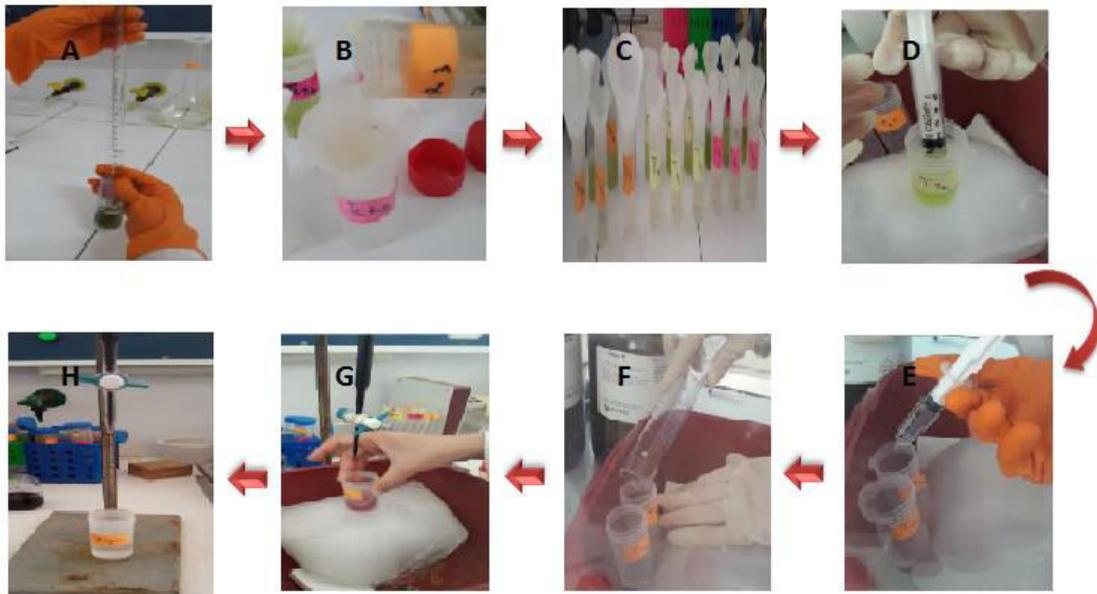


Figure 11: Dosage enzymatique de catalase. **A, B et C:** Préparation d'extrait enzymatique. **D:** induit 10 ml d'extrait. **E:** Ajoute 10 ml d' H_2O_2 . **F:** Ajoute 25 ml de solution de H_2SO_4 à 2%. **G et H:** Dosage de l' H_2O_2 au permanganate de potassium.

II.9.2. Le peroxydase 'POX'

L'activité POX est mesurée selon la technique décrite par ETERSON et al., (1995) et LIN et KAO., (1999) en utilisant le gaïacol comme donneur d'hydrogène. Le milieu réactionnel contient 50 mL du tampon phosphate pH 7, 9 mM de guaiacol et 19 mM de H_2O_2 . L'extrait enzymatique est ajouté selon sa concentration en protéines. La réaction est initiée par l'addition de H_2O_2 et l'évolution de la cinétique de l'activité peroxydase est suivie pendant mM- une min à 470 nm. L'activité est calculée en utilisant le coefficient d'extinction ($\epsilon = 26.6 \text{ l Cm}^{-1}$ à 470 nm). Une unité de POX est définie par la quantité d'enzyme qui entraîne la formation d'une μmole de tétraguaiacol par minute.



Figure 12: Dosage enzymatique de peroxydase. **A et B :** Préparation d'extrait enzymatique. **C :** Ajoute 10 ml d' H_2O_2 . **D :** Suivre de la cinétique de l'activité de la peroxydase à 470 nm.

II.10. Isolement et quantification des spores des CMA

Les spores sont isolé selon la technique du tamisage humide qui consiste à prendre 10g de sol et les faire passer à travers une série de Tamis : à 45, 125 et 250 μ m de diamètre, récupérer le surnageant de chaque tamis le faire passer sous la loupe binoculaire. Les spores sont isolées et séparer à priori selon la couleur dans des tubes à essais content de l'eau distillée, avant de les monter entre lame et lamelle pour l'identification.

II.11. Analyses statistiques

L'interaction entre les paramètres biochimiques testés et les traitements d'inoculations sont analysé avec une ANOVA afin de définir la relation entre la salinité/plante/bio-fertilisant.

Chapitre III

Résultats et discussion

I. Résultats :

I.1. Paramètre de croissance

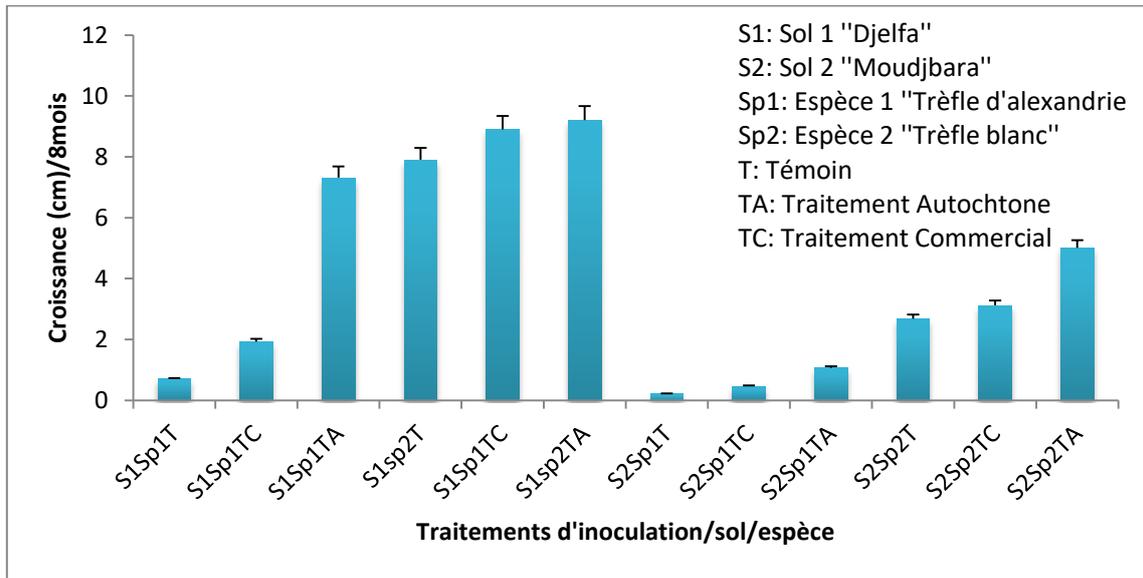


Figure 13: Résultats des paramètres de croissances des deux espèces de Trèfles dans les deux types de sols salins étudiés.

Les résultats de la figure 13 montrent clairement une nette amélioration de la croissance des plantules des deux espèces de trèfle dans les deux types de sols salins utilisés comme substrat. D'un autre coté le traitement d'inoculation commerciale améliore en moindre qualité que le traitement autochtone mais plus significativement que le témoin non inoculé la croissance des plantules de Trèfle.

I.2. Résultats du dosage des protéines totales solubles

Le dosage de protéines totales nous a permis de tracer les histogrammes de la figure 14.

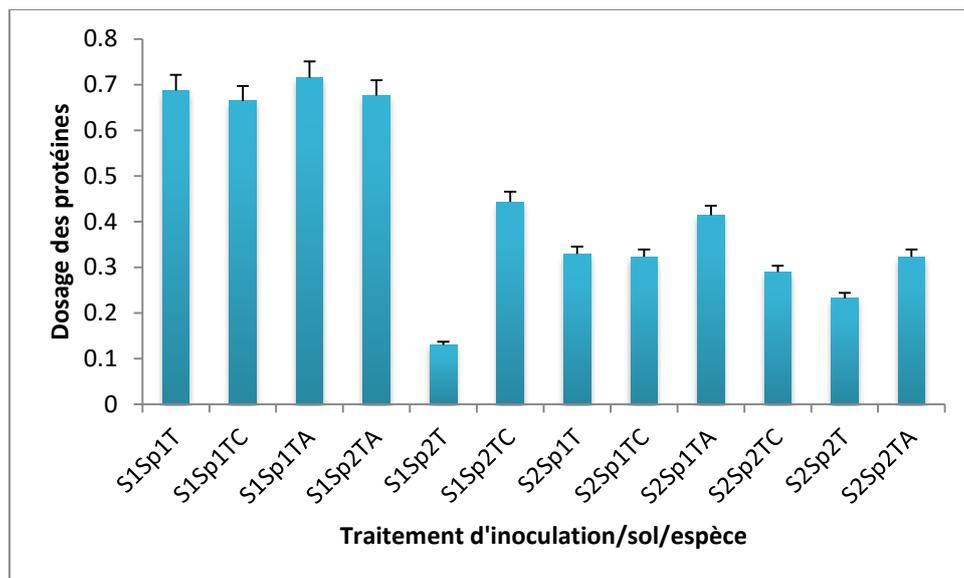


Figure 14 : Résultats du dosage des protéines des deux espèces de Trèfles étudiées.

Les résultats de la figure 14 montrent clairement que le teneur en protéine totaux chez les deux espèces de Trèfles est stimulé par l'inoculum autochtone.

I.3. Résultats du dosage des éléments minéraux

I.3.1. Dosage du phosphore

Le phosphore de la matière végétale des deux espèces de Trèfles dosé par la méthode colorimétrique nous a donné les résultats de la figure 15. Nous constatons une fluctuation des teneurs de phosphore dans les parties aériennes suite à l'inoculation par les deux types de traitements spécifiquement pour l'espèce 2 (*T. repens*). L'espèce *T. alexandrinum* n'a pas été sensible aux traitements d'inoculation dans le sol 1 (CE=1.9 ds.m⁻¹). Tandis que dans le deuxième substrat (CE= 2.8 ds.m⁻¹) l'inoculum autochtone a amélioré la teneur des parties aérienne en phosphore.

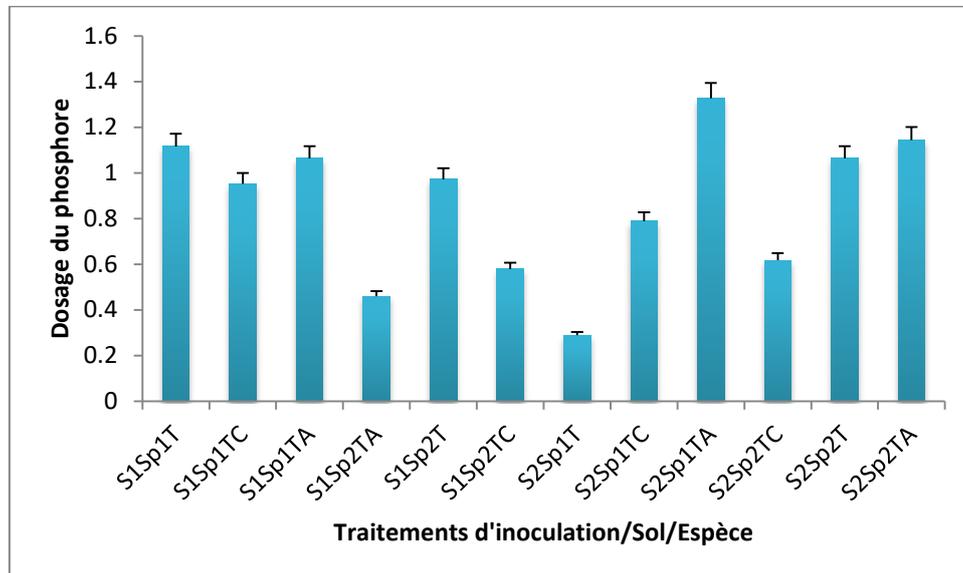


Figure 15: Résultats du dosage du phosphore chez les deux espèces de Trèfles étudiées.

I.3.2. Dosage des Na, Cl et K

Le dosage des éléments minéraux K, Na et Cl est un paramètre important dans la détermination de la toxicité des sels vis-à-vis des plantes.

I.3.2.1. Ratio K/Na

Nous avons constaté d'après les résultats de la figure 16 que le traitement d'inoculation autochtone favorise la teneur en potassium K par rapport au sodium Na.

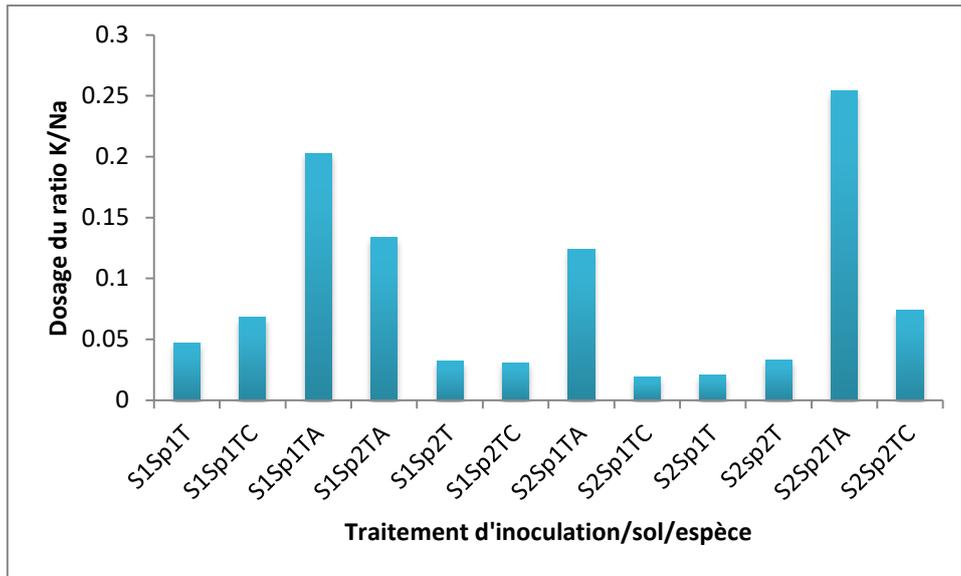


Figure 16: Résultats du dosage des éléments minéraux Na et K dans les parties aériennes des deux espèces de Trèfles étudiées.

I.3.2.2. Ratio Cl/Na

Nous constatons sur les résultats de la figure 17 que le traitement d'inoculation autochtone diminue considérablement la teneur des éléments toxiques Na et Cl dans les parties aériennes des deux espèces de Trèfles étudiées.

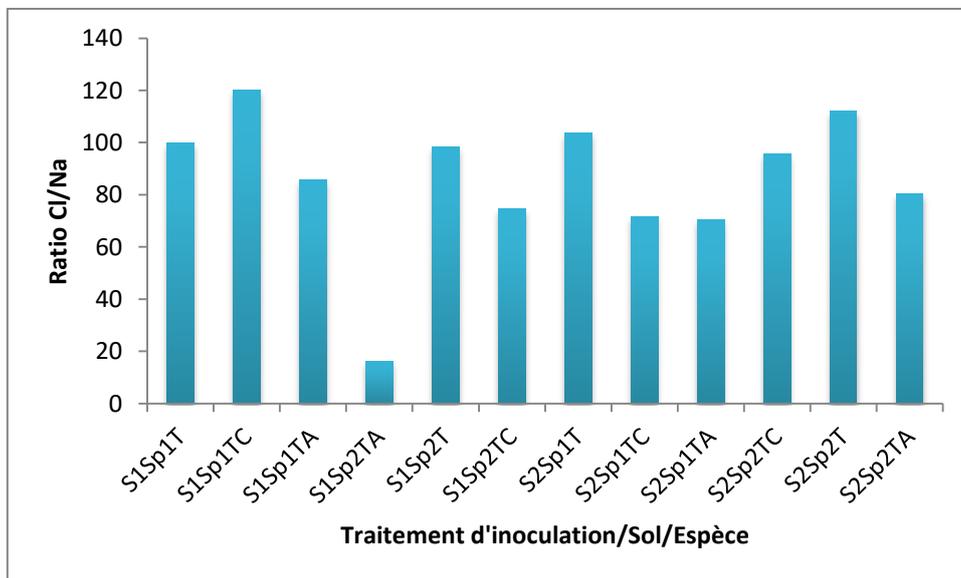


Figure 17: Résultats du dosage des éléments minéraux Na et Cl dans les parties aériennes des deux espèces de Trèfles étudiées.

I.4. Dosage des chlorophylles :

Le dosage de la chlorophylle a, b réalisé sur la matière végétale fraîche des deux espèces de Trèfles étudié sur les deux sols salin nous a permis de tracer les histogrammes de la figure 18. Nous constatons que pour le substrat 1 (CE= 1.9ds.m⁻¹) l'inoculation avec les biofertilisants à base de CMA confondus donne de bonnes résultats par rapport au témoin non-inoculé. Toutefois, l'inoculum autochtone donne de très bons résultats en matière de chlorophylle b pour l'espèce 1 (Trèfle d'Alexandrie) par comparaison à la deuxième espèce (Trèfle blanc). Dans le cas du deuxième sol (CE= 2.85 ds.m⁻¹) l'inoculation a amélioré le taux de chlorophylle pour l'espèce trèfle d'Alexandrie avec l'inoculum commercial, tandis que l'inoculum autochtone n'a pas donné de bons résultats par rapport au témoin. Concernant l'espèce *T. repens*, une légère amélioration du taux de chlorophylle a été obtenue avec l'inoculum autochtone, alors que les résultats avec l'inoculum commercial sont presque identiques à ceux du témoin.

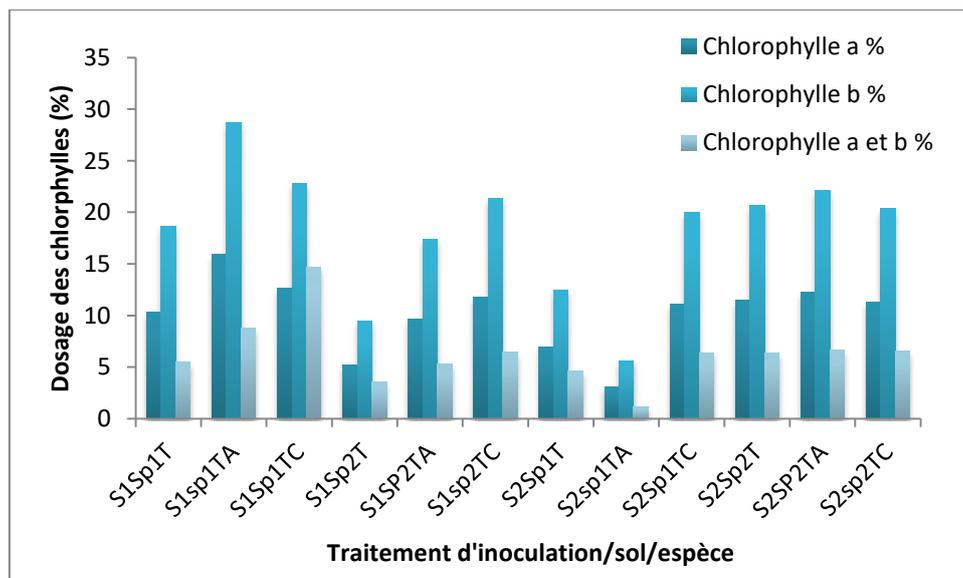


Figure 18: Résultats du dosage de chlorophylles des parties aériennes des deux espèces de Trèfles étudiées.

I.5. Dosage de la proline :

Les résultats du dosage de la Proline apparaissant sur la figure 19 montrent que l'inoculum autochtone diminue significativement la synthèse de la proline chez les deux espèces végétales étudiées, tandis que l'inoculum commercial n'a manifesté aucun effet

positive sur l'état de stress des deux espèces végétales sur les deux sols salins étudiés et ce en comparaison avec le témoin non-inoculé.

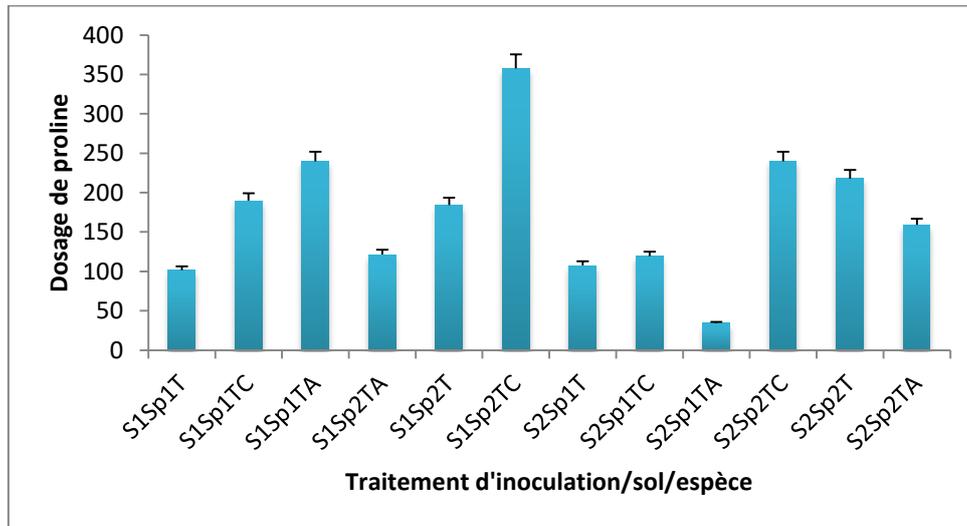


Figure 19: Résultats du dosage de la Proline chez les deux espèces végétales étudiées.

I.6. Résultats du dosage des activités enzymatiques : (catalase et peroxydase "POX")

I.6.1. Catalase

Le dosage de l'activité enzymatique Catalase nous a permis d'obtenir les résultats de la figure 20.

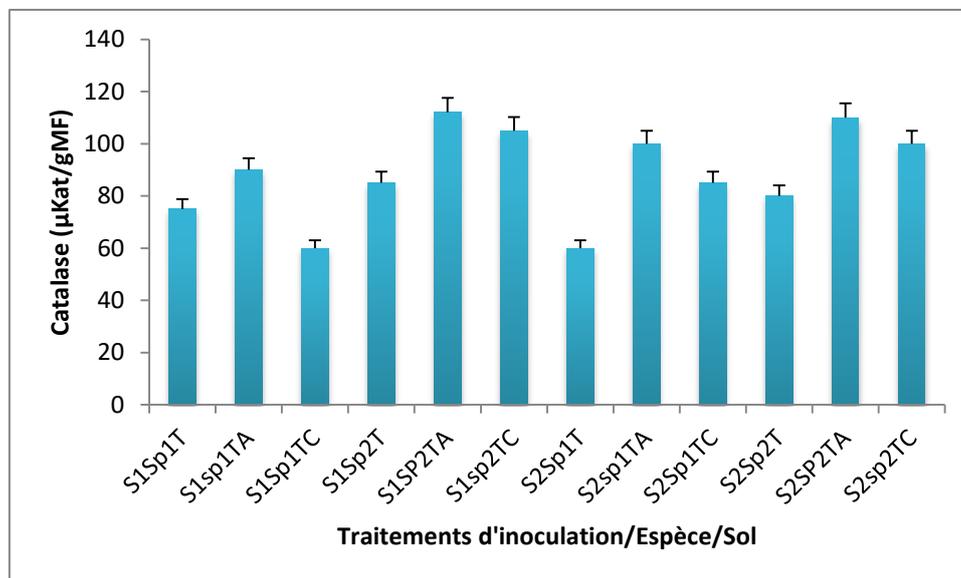


Figure 20 : Résultats du dosage de l'activité enzymatique Catalase.

Les résultats de la figure 20 montrent une activité enzymatique améliorée par les deux traitements d'inoculation par comparaison aux témoins non-inoculés. La comparaison entre

les deux traitements d'inoculations montre une amélioration avec le traitement autochtone par rapport au traitement commercial.

I.6.2. Peroxydase ‘POX’

Les résultats du dosage de l'activité enzymatique Peroxydase (POX) nous ont permis de réaliser les graphes de la figure 21.

Nous pouvons constater d'après la figure 21 que l'inoculum autochtone stimule positivement l'activité enzymatique POX dans les deux sols salins étudiés et pour les deux espèces de Trèfles. Parallèlement, l'inoculum commercial de son coté à jouer un rôle positif pour l'amélioration de l'activité enzymatique dosée en comparant les résultats avec ceux du témoin non-inoculé.

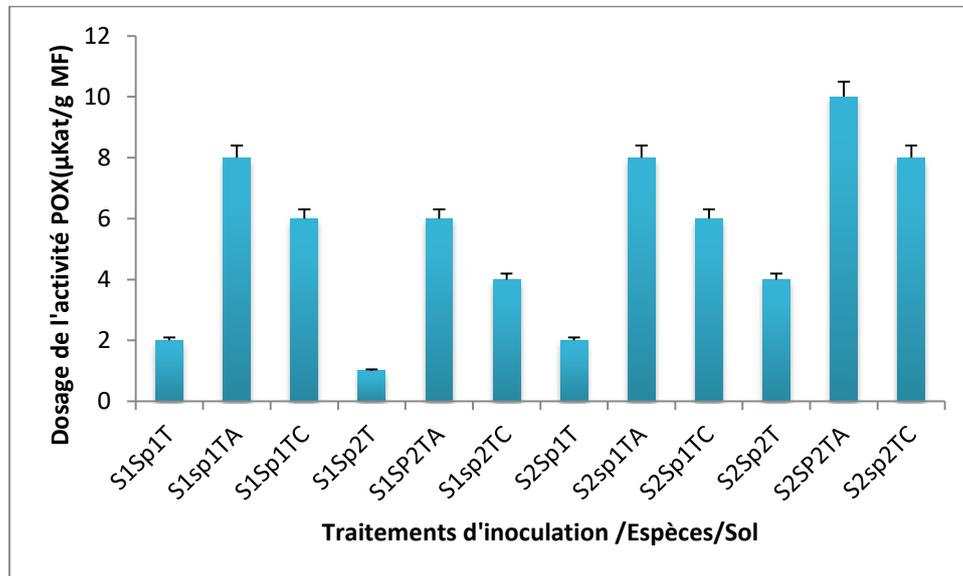


Figure 21: Résultats du dosage de l'activité enzymatique Peroxydase.

I.7. Analyse statistique

L'analyse de la variance réalisée pour les paramètres étudiés combiné au nombre de spores par espèce de CMA montre clairement un effet significativement positif du traitement d'inoculation sur le développement physiologique des deux espèces de trèfles étudiées (Tableau 8). Les résultats montrent que les espèces de trèfles sont significativement influencées par l'inoculation arbusculaire et beaucoup plus par le traitement autochtone par comparaison au traitement commercial.

Tableau 8 : L'interaction entre les espèces de trèfles, le sol et les traitements d'inoculation :

			Espèces × Sol	Sol × traitement inoculation	Espèces × Sol × Traitement d'inoculation
	Espèces	Sol			
Valeur de F	29.144	77.016	2.68	3.36	0.79
Inoculation mycorhizienne autochtone	***	***	**	***	***
Valeur de F	34.24	28.90	5.64	1.180	0.28
Inoculation mycorhizienne commercial	*	**	*	**	*

* :p<0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001.

II. Discussion

Notre présente étude a porté sur l'impact des champignons mycorhiziens arbusculaire sur le développement et les fonctions biochimiques de deux espèces de trèfles sur des sols naturellement salins des régions semi-arides algériennes.

Les trèfles sont des plantes fourragères de grandes valeurs nutritives qui sont très peu utilisés dans les steppes algériennes à salinité élevée. De ce fait l'introduction d'un facteur symbiotique permettant leur adaptation dans ces milieux serait d'une grande utilité.

Dans notre étude, nous avons constaté que les deux espèces de Trèfles étudiées, *T. alexandrinum* et *T. repens* ont réagi positivement aux traitements d'inoculation autochtone et ce sur les deux substrats étudiés. De même nous avons également constaté que l'espèce *T. repens* s'est développée plus significativement que l'espèce *T. alexandrinum*. Ces résultats concordent avec ceux d'EL-HINDI et al. (2017) et MEGLOULI et al. (2018), qui ont travaillé dans les mêmes conditions. Cette croissance positive peut être attribuée à l'amélioration de la nutrition minérale qui est constaté par l'augmentation du taux de phosphore dans les parties aériennes des plantules inoculées avec le traitement autochtone. Ces paramètres combinés indiquent une meilleure adaptation à la salinité des deux espèces de trèfles. En effet, l'amélioration de la tolérance à la salinité par l'apport des champignons mycorhiziens arbusculaires est conditionnée par un perfectionnement de l'activité photosynthétique et une meilleure efficacité d'absorption hydrique (RUIZ-LOZANO et al., 2000). Un effet comparable de l'inoculum autochtone a été enregistré avec *Gossypium arboreum* (BADDA et al., 2014), et également avec *Casuarina equisetifolia* (DIAGNE et al., 2018). La biodiversité de l'inoculum autochtone et l'adaptation à la salinité et aux conditions environnementales des zones semi-arides ont certainement contribué à cette performance. Ces observations nous permettent de suggérer que le comportement et l'efficacité des inoculums mycorhiziens arbusculaires seraient liés à leurs milieux d'origine et plus précisément aux facteurs environnementaux de leurs habitats.

Nous avons enregistré une amélioration de la teneur en chlorophylle chez les plantules inoculées par rapport aux plantules non-inoculées notamment celles traitées avec l'inoculum autochtone. En effet, il a souvent été établi que les champignons mycorhiziens arbusculaires affectent la physiologie et la biochimie de la plante hôte par une augmentation de la photosynthèse qui se manifeste par les taux élevés de chlorophylle (DIAGNE et al., 2018).

L'adaptation des plantules des deux espèces de Trèfles au stress salin est associée aux changements biochimiques au niveau de la plante : accumulation des protéines totaux et de la proline, changement de la composition lipidique des membranes, altération de l'expression de certains gènes (TAIN et al., 2004). D'après nos résultats, le stress salin n'a pas conduit à une accumulation de proline dans les tissus foliaires des plantules inoculées par les deux types d'inoculum arbusculaires. Des résultats semblables ont été enregistrés avec les travaux d'ELHINDI et al. (2017) et ceux de DIAGNE et al. (2018).

Les résultats du dosage des éléments minéraux dans notre présente étude ont permis d'enregistrer une augmentation de l'absorption des ions K^+ dans les plantules de *T. alexandrinum* et *T. repens* inoculé spécialement avec l'inoculum autochtone, avec une réduction de l'absorption de Na^+ et Cl^- . L'inoculum commercial a manifesté un effet positif chez *T. alexandrinum* dans le sol à $CE= 2.95ds.m^{-1}$. L'augmentation des ions K^+ a pour effet de réduire l'effet toxique des ions Na^+ et Cl^- avec une amélioration de la croissance végétative. Les résultats de cette étude sont conformes avec les précédents travaux de TAIN et al., (2004) ; CENGIZ et al., (2009) ; GARG and PENDAY, (2016) ; EL-HINDI et al., (2017). Parmi les mécanismes qui ont permis aux plantes mycorhizées de montrer une meilleure tolérance à la salinité c'est la mise en valeur de la conductance stomatique (AUGÉ et al., 2008), de l'amélioration de la transpiration, du taux des ions K^+ et de la quantité de phosphore. Les ions K^+ sont vital pour la plante afin qu'elle puisse faire face aux stress abiotiques, cette soluté cationique joue un rôle clés dans la conductance stomacale (ELHINDI et al., 2017). Ce qui nous permet de conclure clairement que la tolérance des plantes inoculées avec les CMA à la salinité est en partie le résultat de la prévention de l'absorption de Na^+ et son transfert par les racines aux parties aériennes. En outre l'amélioration apportée par les CMA à l'absorption du phosphore peut aussi être un facteur de tolérance à la salinité. Ce phénomène peut être élucidé par le rôle du phosphore dans le maintien de la stabilité de la membrane vacuolaire et compartimer par la suite les ions Na^+ à l'intérieur de la vacuole afin qu'ils n'endommagent pas l'équilibre osmotique (BOTHE et al., 2012 ; ELHINDI et al., 2017). Ceci permet également de maintenir le fonctionnement équilibré de la voie métabolique sans qu'elle ne soit déstabilisée par les ions Na^+ , ce qui a comme résultat final de réduire les effets néfastes de la salinité (KHALED et TEIXEIRA DA SILVA., 2010). En Outre, il a été prouvé que l'accroissement de l'absorption du phosphore par les CMA aide la vacuole à maîtriser l'infiltration des anions Cl^- . Ceci peut être expliquer par un bon drainage

du carbone effectuée par les hyphes des CMA, ce qui améliore le transfert des anions mobiles tel que Cl^- (ELHINDI et al., 2017).

La proline joue un rôle dans la résistance de la plante à la salinité, c'est l'un des facteurs qui contrôlent l'ajustement osmotique, en effet l'accumulation de la proline est considérée comme un signe de stress salin chez les plantes (YOSHIBA et al., 1997). Dans la présente étude la teneur en proline chez les plantules de *T. alexandrinum* et *T. repens* sous les conditions de salinité sont significativement faibles chez les plantules inoculées par rapport à celles non-inoculées et plus précisément chez les plantules inoculées avec l'inoculum autochtone par rapport à l'inoculum commercial. Cette diminution dans l'accumulation de proline chez les plantules mycorhizées indique que ces plantules sont moins stressées.

Les résultats de notre étude mettent en évidence l'effet positif des souches de CMA autochtone sur le développement et le rendement fourrager des deux espèces de Trèfles, ce rendement peut être évalué par la teneur en protéine qui représente l'élément essentiel aux bétails attendus de ces types de plantes. Ceci pourrait s'expliquer par une augmentation du taux de photosynthétats de la plante grâce aux CMA (NDOYE et al., 2016). De même, NDOYE et al. (2013) expliquent que la réponse des plantes à l'inoculation mycorhizienne dépend des interactions: CMA/plante/sol. De plus notre étude a mis en évidence l'efficacité de deux interactions *T. alexandrinum*/CMA autochtone/Sol salin et *T. repens*/CMA/Sol salin.

Conclusion

Conclusion

Cette étude a démontré que le Trèfle d’Alexandrie et le Trèfle blanc répondent bien à l’inoculation avec des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) en conditions semi-contrôlées. De plus cette étude suggère que les espèces de CMA autochtones pourrait jouer un rôle important dans l’amélioration de la croissance des deux espèces de Trèfles : *T. alexandrinum* et *T. repens*, et que ces mêmes espèces jouent un rôle important dans la résistance des deux espèces de trèfles aux stresse salin des zones semi-arides algériennes. Il a également été constaté que l’inoculation avec les souches autochtones de CMA a amélioré les fonctionnalités biochimiques par l’augmentation des paramètres de photosynthèse et ceux de la résistance à la salinité. Il est important de signaler que les espèces de trèfles ont des rôles écologiques qui peuvent se manifester dans l’enrichissement des sols, la limitation des parcelles, ils ont également un rôle antiérosif et peuvent être utilisés comme biocarburant.

De ce fait, le fait d'améliorer la production des différentes espèces de légumineuses par la biofertilisation à base de champignons mycorhiziens arbusculaire, permet d'améliorer non seulement le rendement économique et fourrager de ces espèces, mais également il y a une modification positive de l'écosystème. Le rôle des biofertilisants va au-delà de l'amélioration des plantes, il touche également les rendements animaliers, plus la valeur nutritionnelle des fourrages est optimiser plus la qualité et la quantité des productions animalière est améliorée.

Tout est lié dans les écosystèmes, et ces liaisons méritent d’être étudiées d’une façon plus approfondie. En effet des travaux complémentaires devront être menés pour étudier l’impact agronomique des CMA sur la croissance et la productivité des deux espèces de Trèfles et la gestion de la fertilité des sols à grande échelle dans les parcelles paysannes afin de faire des recommandations sur l’utilisation des CMA comme biofertilisants. Il serait également intéressant d’approfondir les études, et confier l’impact de la bio fertilisation sur l’élevage dans les écosystèmes steppiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **ABDEL LATEF A. & CHAOXING H., 2011** - Arbuscular mycorrhizal influence on growth, photosynthetic pigments, osmotic adjustment and oxidative stress in tomato plants subjected to low temperature stress. *Acta Physiol. Plant.* 33, 1217–1225.
2. **ABDEL LATEF A. & MIRANSARI M., 2014** - The role of arbuscular mycorrhizal fungi in salt stress, in: Miransari, M. (Eds.), *Use of microbes for the alleviation of soil stresses*, Springer Science and Business Media New York. pp. 23–39.
3. **ABDELBAKI G.K., SIEFRITZ F., MANN H.M., WELNER H., KALDENHOFF R. & W M KAISER., 2000** - Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell Environ.* 23: 15-521.
4. **ABDELGUERFI-LAOUAR M., BOUZID L., ZINE F., HAMDI N., BOUZID H. & ZIDOUNI F., 2001** - Evaluation de quelques cultivars locaux de pois chiche dans la région de Béjaia. *Recherche Agronomique (INRA)* 9: 31-42.
5. **ACKERSON R.C. & HERBERT R.R., 1981** - Osmoregulation in cotton in response to water stress. I. Alterations in photosynthesis, leaf conductance, translocation, and ultrastructure, *Plant Physiol.* 67: 484–488.
6. **AGASTIAN P., KINGSLEY S.J. & VIVEKANANDAN M., 2000** - Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica* 38, 287-290.
7. **ALEM C. & AMRI A., 2005** - Importance de la stabilité des membranes cellulaires dans la tolérance à la salinité chez l'orge. Vol 4 Maroc, PP 20-32.
8. **ALEXANDER M., 1984** - Ecology of *Rhizobium*, in: *Biological Nitrogen Fixation, Ecology, Technology and Physiology*, Plenum Press N.Y. pp. 39–50.
9. **ANDRIEU J., 1983** - "Valeur alimentaire des associations graminées-trèfle blanc et prévision de leur valeur nutritive", *Supplément de la revue Fourrages*, **94-95**: 145-160.
10. **ANTIPOLIS S., 2003** – Les cahiers du plan bleu 2. Les menaces sur les sols dans les pays méditerranéens. Etude bibliographique. P 71.

11. ARCHER K.A. & ROBISON G.G., 1989 - The role of stolons and seedlings in the persistence and production of white clover (*Trifolium repens* L. cv. Huia) in temperate pastures on the Northern Tablelands, New South Wales. *Australian Journal of Agricultural Research* **40**: 605-616.
12. AROCA R., PORCEL R. & RUIZ-LOZANO J.M., 2007 - How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* **173**: 808–816.
13. ASHRAF M.Y. & BHATTI A.S., 2000: Effect of salinity on growth and chlorophyll content of Rice. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 43: 130-131.
14. ASPINALL D. & PALEG L.G., 1981 - Proline accumulation: Physiological aspects. In *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants* (L.G.Paleg and D. Aspinall, eds.), pp.205-241. (Academic Press: Sydney.)
15. AUGÉ R.M., 2001 - Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3–42.
16. AYRES J.F., DAVIES H.L., FARQUHARSON R.J. & MURISON R.D., 2000 – The contribution of pasture research for animal production from legume-based pastures in temperate Australia. *Asian Australian Journal of Animal Sciences* **13** (suppl. 2000B): 1-4.
17. BADO B.V., 2002 - Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina-Faso. *Thèse de doctorat*, l'université de Laval.
18. BAGNI N. & TASSONI A., 2001 - Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**: 301–317.
19. BAGO B., VIERHEILIG H., PICHE Y. & AZCÓN-AGUILAR C., 1996 - Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New phytologist*, 133: 273-280.
20. BAKER N.R., 1991 - A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis, *Physiol. Plant* 81: 563–570.
21. BAREA J.M., POZO M.J., AZCÓN R. & AZCÓN-AGUILAR C., 2005 - Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany* **56**: 1761–78.

22. BEKKI A., TRINCHANT J.C. & RIGAUD J., 1987 - Nitrogen fixation (C₂H₄ reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress, *Physiol. Plant.* 71: 61–67.
23. BEN KHALED L., GOMEZ A.M., OIHABI A. & HONRUBIA M., 2003 – Effet du stress saline n milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le rhizobium. *Agronomie.* 23: 553-560.
24. BEN MBAREK K., BOUJELBEN A., BOUBAKER M. & HANNACHI C., 2009 - Criblage et performances agronomiques de 45 génotypes de pois chiche (*Cicer arietinum L.*) soumis à un régime hydrique limité. 13(3) :381-393.
25. BENEDETTO A., MAGURNO F., BONFANTE P. & LANFRANCO L., 2005 - Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 620-627.
26. BENSON D.R. & SILVERTER W.B., 1993 - Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Reviews* 57: 293-319.
27. BETTS J. & AYRES J., 2004 - White clover *Trifolium repens*. *Agnote DPI-270*, third edition NSW Department of Agriculture.
28. BHATTACHARYYA P.N. JHA D.K., 2012 - Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiotechnology.* 28(4):1327-50.
29. BIDAR G., GARCON G., PRUVOT C., DEWAELE D., CAZIER F., DOUAY F. & SHIRALI P., 2007 - Behaviour of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* 147: 546-553.
30. BOUKCIM H., PAGES L., PLASSARD C. & MOUSAIN D., 2001 - Root system architecture and receptivity to mycorrhizal infection in seedlings of *Cedrus atlantica* as affected by nitrogen source and concentration. *Tree Physiology* 21:109–115.
31. BOUNEJMATE M., 1997 - Bersim (*Trifolium alexandrinum*). In: Jaritz, G.; Bounejmate, M., Production et utilisation des cultures fourragères au Maroc, INRA, Rabat (Maroc), 144-147.

32. **BRADFORD M.M., 1976** - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *anal. Biochem.* 72: 248-254.
33. **BROUGHTON W.J., HERNANDEZ G., BLAIR M., BEEBE S., GEPTS P. & VANDERLEYDEN J., 2003** - Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128.
34. **BRUN L.A., MAILLET J., RICHARTE J., HERRMANN P. & REMY J C., 1998** - Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution*, 102(2-3), 151-161.
35. **BRUNDRETT M., 1991** - Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances. Ecological Research* 21: 171-313.
36. **BÜCKING H. & SHACHAR-HILL Y., 2005** - Phosphate uptake, transport and transfert by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New phytologist*, 165: 899-912.
37. **CHALCK P.M., 1998** - Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: a review. *Australian Journal of Research* 49: 303-316.
38. **CHANG C.H. & YANG S.S., 2009** - Thermotolerant phosphate solubilizing microbes for multifunctional bio-fertilizer preparation. *Bioresearch Technology*. 100(4):1648-58.
39. **CHARTZOULAKIS K. & KLAPAKI G., 2000** - Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci. Hortic.* 86, 247-260.
40. **CHEVERY C. & ROBERT M., 1993** – Salure des sols maghrébins, influence sur les propriétés physiques et physicochimiques des sols. Répercussion des modifications de ces dernières sur la fertilité notamment azotée des sols. ENSA.P59.
41. **CHOUDHURY M.A. & KENNEDY I.R., 2004** - Prospect and potentials for system of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biological Fertilizer and Soil*. 39: 219-27.
42. **CICATELLI A., TORRIGIANI P. & TODESCHINI V., 2014** - Arbuscular mycorrhizal fungi as a tool to ameliorate the phytoremediation potential of

- poplar: biochemical and molecular aspects. *iForest - Biogeosciences For* 7:333–341.
43. CLARK A., 2008 - Berseem. In: Clark (Ed.), *Managing cover crops profitably*, Diane Publishing, 2008.
44. COME D. & FRANCOISE C., 2006 - *Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes*, Edition Tec et Doc. Lavoisier.
45. CORDIER C., POZO M.J., BAREA J.M., GIANINAZZI S. & GIANINAZZI-PEARSON V., 1998 - Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 11: 1017-1028.
46. CORNEJO P., MEIER S., BORIE G., RILLIG M.C. & BORIE F., 2008 - Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Science of the Total Environment* 406: 154–160.
47. CRAMPTON B., 1985 - Native range clovers. In: *Clover Science and Technology*. American Society of Agronomy, Madison. pp. 579-590.
48. CRUSH J.R., 1987 - Nitrogen fixation. In: MJ Baker, WM Williams, eds. *White clover*. CAB International Wallingford. pp. 185-201.
49. DAEI G., ARDEKANI M., REJALI F., TEIMURI S. & MIRANSARI M., 2009 - Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. *Journal of Plant Physiology* 166: 617–625.
50. DALPÉ Y., 2005 - Mycorrhizae: a potential tool for plant protection but not a panacea. *Phytoprotection* 86: 53-59.
51. DANSO S.K.A., 1995 - Assessment of biological nitrogen fixation. *Fertilizer research* 42: 33-41.
52. DEBIANE D., GARÇON G., VERDIN A., FONTAINE J., DURAND R., SHIRALI P., GRANDMOUGIN-FERJANI A. & LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI A., 2008 - *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environ. Exp. Bot.* 64, 120–127.
53. DEBIANE D., GARÇON G., VERDIN A., FONTAINE J., DURAND R., SHIRALI P., GRANDMOUGIN-FERJANI A. & LOUNÈS-HADJ

- SAHRAOUI A., 2009 - Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry* 70, 1421–1427.
54. DELGADO M.J, GARRIDO J.M., LIGERO F. & LLUCH C., 1993 - Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress, *Physiol. Plant.* 89: 824–829.
55. DELGADO M.J., LIGERO F. & LLUCH C., 1994 - Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants, *Soil Biol. Biochem.* 26: 371–376.
56. DENDEN M., BETTAIEB T., ALEF SALHI. & MATHLOUTHI M., 2005 - Effet de la salinité sur la fluorescence chlorophyllienne, la teneur en proline et la production florale de trois espèces ornementales. *Tropicultura*. P : 1.
57. DEQUIEDT B., 2012 - Réduire les émissions de l’agriculture : l’option des légumineuses. P4.
58. DOWNIE J.A., 2005 - Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology* 15: 6.
59. DOYLE J.J., 1998 - Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* 3(12): 473-478.
60. DREVN J.J., ABDELLY C., AMARGER N., AOUANI E.A., AURAC J., GHERBI H., JEBARA M., LIUCH C., PAYRE H., SCHUMP O., SOUSSI M., SIFI B. & TRABELSI M., 2001 – An interdisciplinary research strategy to improve symbiotic nitrogen fixation and yield of comm. Bean (*phaseolus vulgaris*) in salinized areas of the Mediterranean basin. *J.Biotech.* 91: 257-268.
61. DUC G., MIGNOLET C., CARROUÉE B. & HUYGHE C., 2010 - Importance économique ?passée et présente des légumineuses : *Innovations Agronomiques*, 11 :1-24.
62. ELLISON N.W., LISTON A., STEINER J.J., WILLIAMS W.M. & TAYLOR N.L., 2006 - Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*-Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 688-705.

- 63. EL-NAHRAWY M.A., 2011** - Country Pasture/Forage resource profiles: EGYPT. FAO, Rome.
- 64. ELSEN A., BEETERENS R., SWENNEN R. & WAELE D., 2003** - Effects of an arbuscular mycorrhizal fungus and two plantparasitic nematodes on Musa genotypes differing in root morphology. *Biology and Fertility of Soils* **38**: 367–376.
- 65. ERITH A.G., 1924** - "White clover. Monographs on agricultural plants J. Percival, ed.
- 66. ESPELETA J.F. & EISSENSTAT D.M., 1998** - Responses of citrus fine roots to localized soil drying: a comparison of seedlings with adult fruiting trees. *Tree Physiology* **18**: 113–119.
- 67. ETERSON M.D., PRASAD T.K. & STEWART C.R., 1995** - Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* **109**, 1247-1257.
- 68. EVELIN H., GIRI B. & KAPOOR R., 2012** - Contribution of *Glomus irregularis* inoculation to nutrient acquisition and mitigation of ionic imbalance in NaCl-stressed *Trigonella foenum-graecum*. *Mycorrhiza* **22**: 203–17.
- 69. FEILLET P., 2000** - Le grain de blé: Composition et utilisation. Editions Quae, Paris, France. pp. 308.
- 70. FELIACHI K., 2002** - Le développement des légumineuses alimentaires et les perspectives de Relance en Algérie. Proceedings du 2^{ème} séminaire du Réseau Remafeve/Remala « Le devenir des légumineuses Alimentaires dans le Maghreb ». Hammamet (Tunisie).
- 71. FENG G., ZHANG X., LI X., TIAN C., TANG C. & RENGEL Z., 2002** - Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*, **12**: 185-190.
- 72. FILION M., St-ARNAUD M. & FORTIN J., 1999** - Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus irregularis* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist* **141**: 525–533.

73. FLORES P., BOTELLA M.A., MARTINEZ V. & CEDRA A., 2000 - Ionic and osmotic effects on nitrate reductase activity in tomato seedlings. *J. Plant Physiol.* 156, 552-557.
74. FLOWERS T.J. & YEO R., 1995 – For salinity resistance in crop plant: where next?. *Aust.J.Plant Physiol.* 22: 875-884.
75. FLOWERS T.J., TROKE P.F. & YEO A.R., 1977 - The mechanism of salt tolerance in halophytes, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28: 89–121.
76. FOURY A., 1954 - Les légumineuses fourragères au Maroc. In : Les Cahiers de la Recherche agronomique. Service de la Recherche Agronomique et de l'Expérimentation Agricole, Rabat. pp. 289-656.
77. FRAME J. et NEWBOULD P., 1986 - "Agronomy of white clover", *Advances in Agronomy*, 40: 1-88.
78. FRAME J., 2003 - *Trifolium repens L.* www.fao.org.
79. FRAÚSTRO DA SILVA J.J.R. & WILLIAMS R.J.P., 1991 - The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life. Oxford: Clarendon Press.
80. FREDERIC BOUCHAR., 2010 - Mesure de Salinité. *Tenum.* P : 3.
81. FRITZ M., JAKODSEN I., LYGKJÆR M.F., THORDAL-CHRISTENSEN H. & PONS-KÜHNEMANN J., 2006 - Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16: 413–419.
82. GAAFAR H.M.A., EL-LATEIF A.I.A.A. & EL-HADY S.B.A., 2011 - Effect of replacement of berseem (*Trifolium alexandrinum L.*) hay by berseem silage on performance of growing rabbits. *Archiva Zootechnica*, 14 (4): 59-69.
83. GALLOU A., LUCERO MOSQUERA H.P., CRANENBROUCK S., SUÁREZ J.P. & DECLERCK S., 2011 - Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76: 20–26.
84. GEORGIEV G.I. & ATKINS C.A., 1993 - Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules, *Symbiosis* 15: 239–255.
85. GEPTS P., 2004 - Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant breeding reviews* 24: 1-44.

- 86. GEPTS P., BEAVIS W.D., BRUMMER E.C., SHOEMAKER R.C., STALKER H.T., WEEDEN N.F. & YOUNG N.D., 2005** - Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137: 1228-1235.
- 87. GERARD H., LE SAOS J., BILLARD J.P. & BOUCAUD J., 1991** - Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima* L., *Plant Physiol. Biochem.* 29: 421–427.
- 88. GERNNS H., ALTEN H. & POEHLING H.M., 2001** - Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen – is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11: 237–243.
- 89. GHAFARZADEH M., 1997** - Small grains: economic and biological benefits of intercropping berseem clover with oat in corn-soybean-oat rotations. *J.Prod. Agric.*, 10 (2): 314-319.
- 90. GILLET J.M.X. & TAYLOR N.L., 2001** - The World of Clovers. Iowa State University Press, Ames, USA.
- 91. GIRIJA C., SMITH B.N. & SWAMY P.M., 2002** - Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Env. Exp. Bot.* 47: 1–10.
- 92. GOBAT J.M., ARAGNO M. MATTHEY W., 2003** - Le sol vivant : Bases de pédologie, Biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes (Ed).
- 93. GÖHL B., 1982** - Les aliments du bétail sous les tropiques. FAO, Division de Production et Santé Animale, Roma, Italy.
- 94. GOICOECHEA N., SZALAI G., ANTOLÍN M.C., SÁNCHEZ-DÍAZ M. & PALDI E., 1998** - Influence of arbuscular mycorrhiza and Rhizobium on free polyamines and proline levels in water-stressed alfalfa. *Journal of Plant Physiology* 153:706–711.
- 95. GRAHAM P.H. & VANCE C.P., 2003** - Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872–877.
- 96. GRATTAN S.R. & GRIEVE C.M., 1993** – Mineral Nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. *Handbook Of Plant And Crop Stress*, p 208-218.

- 97. GUIGNARD J.L. & DUPONT F., 2004** - Botanique : systématique moléculaire. 13eme Edition, Masson. Paris. France. 164-179.
- 98. GUIGNARD J.L. & DUPONT F., 2005** - Botanique. 13^{ème} Edition Masson, Paris. pp. 336.
- 99. GUPTA A.K., 2004** - The Complete Technology Book on Biofertilizer and Organic Farming. National Institute of industrial research press India. 242-53.
- 100. HACKNEY B., DEAR B. & CROCKER G., 2007** - Berseem clover. New South Wales Department of Primary Industries, Primefacts, N°388.
- 101. HAMDY A., 1999** – Saline irrigation assessment for a sustainable use saline irrigation. Halophyte production and utilization, project n° IC 18CT 96-0055, p 152-26.
- 102. HAMMER E.C. & RILLIG M.C., 2011** - The influence of different stresses on glomalin levels in an arbuscular mycorrhizal fungus—salinity increases glomalin content. *Plos One* **6**: 28–42.
- 103. HANNAWAY DAVID B. & CHRISTINA LARSON., 2004** - Berseem Clover (*Trifolium alexandrinum* L) Oregon State University.
- 104. HARI M. & PERUMAL K., 2010** - Booklet on Bio-fertilizer (phosphobacteria). Shri Annm Murugapa Chettiar Research Centre Taramani Cheninai.1-6.
- 105. HARRISON A.F., 1987** - Soil organic phosphorus: a review of world literature. Walingford, CAB International.
- 106. HARRISON M.J. & VAN BUUREN M.L., 1995** - A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.
- 107. HART M.M. & FORSYTHE J.A., 2012** - Using arbuscular mycorrhizal fungi to improve the nutrient quality of crops; nutritional benefits in addition to phosphorus. *Scientia Horticulturae* **148**: 206–214.
- 108. HAWKINS H.J., JOHANSEN A. & GEORGE E., 2000** - Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* **226**: 275-285.
- 109. HETRICK BAD., 1984** - Ecology of VA mycorrhizal fungi. In: Powell, C.LÍ., Bagyaraj, D.J. (Eds.), VA Mycorrhizae. CRC Press, Boca Raton.

110. **HOLDEN M., 1965** - Chlorophylle. Goodwin, T.W. ed. *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Academic Press. 461-488.
111. **HOLMS I., 1992** - *Laukaugu selekcija Latvijā [Crop Breeding in Latvia]*. Avots, Rīga. 190 lpp. (in Latvian).
112. **HOPKINS W.G., 2003** - Physiologie végétale. Livre, De Boeck Université rue des Minimes 39, B-1000 Bruxelles. P: 452- 464.
113. **HOPKINS W.G., 2003** - Physiologie végétale. Traduction de la 2^{ème} édition américaine par SERGE R. Ed. De Boeck, p 66-81.
114. **HOUMANI M., 1999** - Situation alimentaire du bétail en Algérie. *INRA* 4: 35-45.
115. **HOWES F.N., 2007** - Clover. In: *Plants and beekeeping*. Read Books. pp. 52-58.
116. **I.C.A.R., 2012** - Forage crops and grasses. In: *Handbook of agriculture*, 6th ed. 2012, ICAR.
117. **IRIGOYEN J.J., EMERICH D.W. & SANCHEZ-DIAZ M., 1992** - Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants, *Physiol. Plant.* 84: 55–60.
118. **ISMAIL Y. & HIJRI M., 2010** - Induced resistance in plants and the role of arbuscular mycorrhizal fungi, in: Thangadurai D, Busso CA, Hijri M. (Eds), *Mycorrhizal biotechnology*, CRC Press, USA, pp. 77–99.
119. **ISMAIL Y., McCORMICK S. & HIJRI M., 2011** - A fungal symbiont of plant-roots modulates mycotoxin gene expression in the pathogen *Fusarium sambucinum*. *PloS one* 6:1–7.
120. **JAHROMI F., AROCA R., PORCEL R. & RUIZ-LOZANO J., 2008** - Influence of Salinity on the In Vitro Development of *Glomus irregularis* and on the In Vivo Physiological and Molecular Responses of Mycorrhizal Lettuce Plants. *Microbial Ecology* 55: 45–53.
121. **JAHUFER Z., ROGERS H. & ROGERS M.J., (2001)** - White clover. Department of Natural Resources and Environment, Victoria.
122. **JANOS DP., 1980** - Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica*, 12, 56-64.
123. **JANSONE B., 2008** - Baltais āboliņš [White clover]. In: Jansone, B., Rancāne, S., Dzenis, V., Jansons, A. (eds.). *Ceīvedis daudzgadīgo zālaugu sēklaudzģdanā* [Manual of Seed Production of Forage Grasses]. LLU

- Zemkopības zinātniskais institūts, SIA Publishing Agency, Skrīveri, pp. 78–87 (in Latvian).
- 124. JAVOT H., PUMPLIN N. & HARRISON M.J., 2007** - Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant cell and environment*, 30, 310-322.
- 125. JEFFREY R., SEEMANN. & CHRISTA CRITCHLEY., 1985** - Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L., *Planta* 164: 151–162.
- 126. JEZIERNY D., MOSENTHIN R. & BAUER E., 2010** - The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: *A review. Animal feed science and technology* 157:111-128.
- 127. JUNG S., GARCÍA-ANDRADE J., VERHAGE A., FERNÁNDEZ I., GARCÍA J., AZCÓN-AGUILAR C. & POZO M., 2009** - Arbuscular mycorrhiza confers systemic resistance against *Botrytis cinerea* in tomato through priming of JA-dependent defense responses. In: Mauch-Mani B, Schmidt A, eds. *Induced resistance: chances and limits. Proceedings of the meeting at Granada, Espagne: IOBC/wprs Bulletin, Working Group “Induced resistance in plants against insects and diseases.”*
- 128. JUNG S.C., MARTINEZ-MEDINA A., LOPEZ-RAEZ J.A. & POZO M.J., 2012** - Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of chemical ecology* 38: 651–664.
- 129. KAPOOR R., SHARMA D. & BHATTNAGAR A.K., 2008** - Arbuscular mycorrhizae in micro propagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae* 116: 227–239.
- 130. KEIPER F.J., CHEN D.M. & DE FILIPPIS F.L., 1998** - Respiratory, photosynthetic and ultrastructural changes accompanying salt adaptation in culture of *Eucalyptus microcorys*, *J. Plant Physiol.* 152: 564–573.
- 131. KHALVATI M.A., HU Y., MOZAFAR A. & SCHMIDTHALTER U., 2008** - Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress. *Plant Biology.* 7: 706-712.

132. **KHORSO M. & YOUSEF S., 2012** - Bacterial bio-fertilizers for sustainable crop production: A review APRN Journal of Agricultural and Biological Science. 7(5):237-308.
133. **KOTHARI S., MARSCHNER H. & GEORGE E., 1990** - Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. *New Phytologist*: 303–311.
134. **KRISHNA K.R. & BAGYARAJ D.J., 1984** - Growth and nutrient uptake of peanut inoculated with the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* compared with non-inoculated ones. *Plant Soil* 77: 405-408.
135. **LABAT J.N., 1996** - Biogéographie, endémisme et origine des légumineuses papilionacées de Madagascar. *Biogéographie de Madagascar* 95-108.
136. **LANE L.A., AYRES J.F. & LOVETT J.V., 1997** - A review of the introduction and use of white clover (*Trifolium repens* L.) in Australia – significance for breeding objectives. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37: 831-839.
137. **LAPEYRONIE A., 1982** - Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et production méditerranéenne. Maisonneuve et Larose, Paris.
138. **LARHER F., QUEMENER B. & HERVOCHPN P., 1991** - L'ajustement osmotique pendant la vie végétative de *Cicer arietinum* L. cultivé en présence de chlorure de sodium, *Plant Physiol.* 312: 55–61.
139. **LAUMONT P. & CHEVASSUS A., 1956** - Note sur l'amélioration du pois chiche en Algérie. *Institut Agricole d'Algérie* 10(2): 1-23.
140. **LAUMONT P. & CHEVASSUS A., 1960** - Note sue l'amélioration de la lentille en Algérie. *Ann. Inst. Agr. Des services de recherche et expérimentation Agricole de l'Algérie*, Tome II. Fasc.
141. **LAUTER D.J., MUNNS D.N. & CLARKIN K.L., 1981** - Salt response of chickpea influenced by N supply, *Agron. J.* 73: 961–966.
142. **LE DILY F., BILLARD J.P. & BOUCAUD J., 1991** - Polyamine levels in relation to growth and NaCl concentration in normal and habituated sugar beet callus cultures, *Plant Cell Env.* 14: 327–332.

143. **LE HOUEROU H.N., 2000** – Utilization of fodder trees and shrubs in the arid and semi-arid zones of West Asia and North Africa. *Arid Soil Res. Rehab.* 14: 101-135.
144. **LEVIGNERON A., LOPEZ F., VANSUYT G., BERTHOMIEU P., FOURCROY P. & CASSE-DELBART F., 1995** - Les plantes face au stress salin. *Cahiers Agricultures.*4 (4): 263-273. France.
145. **LEVITT J., 1980** - Respons of plants to environmental stresses : water, radiation, salt and other stresses, Academic Press, New York, pp. 365-488.
146. **LIN C.C. & KAO C.H., 1999** - NaCl induced changes in ionically bound péroxydase activity in root of rice seedlings. *Plant and Soil* 216, 147–153.
147. **LINK J., GRAEFF S., BATCHELOR W.D. & CLAUPEIN W., 2006** - Evaluating the economic and environmental impact of environmental compensation payment policy under uniform and variable-rate nitrogen management. *Agricultural Systems* 91: 135-153.
148. **LIU A., HAMEL C., HAMILTON R.I., MA B.L. & SMITH D.L., 2000** - Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays L.*) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza* 9: 331-336.
149. **LIU J., MALDONADO-MENDOZA I., LOPEZ-MEYER M., CHEUNG F., TOWN C.D. & HARRISON M.J., 2007** - Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 50: 529–44.
150. **LOCY R.D., CHANG C.C., NIELSON B.L. & SINGH N.K., 1996** - Photosynthesis in salt-adapted heterotrophic tobacco cells and regenerated plants, *Plant Physiol.* 110: 321–328.
151. **LODWIG E.M., HOSIE A.H.F., BOURDÈS A., FINDLAY K., ALLAWAY D., KARUNAKARAN R., DOWNIE J.A. & POOLE P.S., 2003** - Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature* 422: 722-726.
152. **LÓPEZ-PEDROSA A., GONZÁLEZ-GUERRERO M., VALDERAS A., AZCÓN-AGUILAR C. & FERROL N., 2006** - *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in

- the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal genetics and biology*, 43: 102-110.
- 153. MA Z.Q. & LAPITAN N.L.V., 1998** - A comparison of amplified and restriction fragment length polymorphism in wheat. *Cereal Research Communication* 26: 7-13.
- 154. MAATHUIS F.J.M., 2009** - Physiological functions of mineral macronutrients. *Current opinion in plant*, 12: 250-258.
- 155. MADANI D., 2008** - Relation entre le couvert végétal et les conditions édaphiques en zone à déficit hydrique. Mémoire de Magister. Université de Batna.
- 156. MALDONADO-MENDOZA I.E., DEWBRE G.R. & HARRISON M.J., 2001** - A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 1140-1148.
- 157. MAOS E.V., 1990** – Crop salt tolerance in : K,K.Tanji (Ed), salinity assessment and management. Amer.Soc.Civil.Eng.
- 158. MARSCHNER H., 1995** - Mineral Nutrition in Higher Plants. Academic Press, London, RU.
- 159. MELONI D.A., OLIVA M.A., RUIZ H.A. & MARTINEZ C.A., 2001** - Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *J. Plant Nutr.* 24, 599-612.
- 160. MERABET B.A., ADBELGUERFI A., BASSAID F. & DAOUD Y., 2005** -Production and forage quality of Berseem clover according to the water supply in Mitidja (Algeria). *Fourrages*, 181: 179-191.
- 161. MERMOUD A., 2006** - Cour de physique du sol. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. P : 2.
- 162. MITSUHASHI N., OHNISHI M., SEKIGUSHI Y., KWON Y.U., CHANG Y.T., CHUNG S.K., INOUE Y., REID R.J., YAGISAWA H. & MIMURA T., 2005** - Phytic acid synthesis and vacuolar accumulation in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* induced by high concentration of inorganic phosphate and cations. *Plant physiology*, 138: 1607-1614.

163. **MOHAMED FARISSI., FAISSAL AZIZ., ABDELAZIZ BOUIZGAREN. & CHERKI GHOULAM., 2014** - La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *International Journal of Innovation and Scientific Research* Vol. 11 No 1. P: 97-99, 101.
164. **MOHAMMAD M., SHIBLI R., ADJOUNI M. & NIMRI L., 1998-** Tomato root and shoot responses to salt stress under different levels of phosphorus nutrition. *J. Plant Nutr.* 21, 1667-1680.
165. **MOLLER K., KRISTENSEN K., YOHALEM D. & LARSEN J., 2009** - Biological management of gray mold in pot roses by coinoculation of the biocontrol agent *Ulocladium atrum* and the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Biological Control* **49**: 120–125.
166. **MUNNS R., 2002** – Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*25: 239-250.
167. **MUNNS R., JAMES R.A. & LAUCHLI R., 2006** - Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*; 57 (5): 1025-1043.
168. **NEUMANN P., 1997** – Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant Cell Environ.* 20: 1193-1198.
169. **OLMOS E. & HELLIN E., 1996** - Cellular adaptation from a salt-tolerant cell line of *Pisum sativum*, *J. Plant Physiol.* 148: 727–734.
170. **OMMAMIE N., 2005** – Response of Amaranth to salinity stress. These of Ph.D.Horticulture. University of Pretoria. Chapter 1, p 5-20,chapter 6, P1.
171. **OUZIAD F., WILDE P., SCHMELZER E., HILDEBRANDT U. & BOTHE H., 2006** - Analysis of expression of aquaporins and Na⁺/H⁺ transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress. *Environmental and Experimental Botany* **57**: 177–186.
172. **PARIDA A.K. & DAS., 2005** - Salt tolerance and salinity effects on plants: *A.Rev.Ecotoxicol. environ. Safety*, 60:324-349.
173. **PARIDA A.K., DAS A.B. & MITTRA B., 2003** - Effect of NaCl stress on the structure, pigment complex composition and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parvi flora* chloroplasts. *Photosynth.* 41: 191-200.

174. **PARMISKE M., 2008** - Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews: Microbiology* 6: 763-775.
175. **PASZKOWSKI U. & BOLLER T., 2002** - The growth defect of *lrt1*, a maize mutant lacking lateral roots, can be complemented by symbiotic fungi or high phosphate nutrition. *Planta* 214: 584–590.
176. **PAUWELS J.M., VAN RANST E., VERLOO M. & MVONDO ZE A., 1992** - Manuel de laboratoire de pédologie. Publications Agricoles no 28. Agence Générale de la Coopération au Développement. Bruxelles.
177. **PČTERSONE A. & BIRKMANE K., 1980** - *Latvijas PSRS augu noteicĶjs* [Key of Latvian SSR plants]. Rīga: Zvaigzne (in Latvian).
178. **PEOPLES M.B., HERRIDGE D.F. & LADHA J.K., 1995** - Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil* 174: 3-28.
179. **PÉREZ-TIENDA J., TESTILLANO P.S., BALESTRINI R., FIORILLI V., AZCÓN-AGUILAR C. & FERROL N., 2011** - *GintAMT2*, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal genetics and biology*, 48: 1044-1055.
180. **PESSARAKLI M., HUBER J.T. & TUCKER T.C., 1989** - Protein synthesis in green beans under salt stress with two nitrogen sources, *J. Plant Nutr.* 12: 1261–1377.
181. **PEPELKA J.C., TERRY N. & HIGGINS T.J.V., 2004** - Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Sciences* 167: 195-206.
182. **POZO M.J. & AZCÓN-AGUILAR C., 2007** - Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current opinion in plant biology* 10: 393–398.
183. **POZO M.J., VERHAGE A., GARCIA-ANDRADE J., GARCIA J.M. & AZCÓN-AGUILAR C., 2009** - Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. Dans: Azcon-Aguilar C., Barea J.M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (eds) *Mycorrhizas: functional processes and ecological impact*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Allemagne, Chapter 9, pp. 123-135.
184. **QUÉZEL P. & SANTA S., 1962** - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Paris.

185. RAHMAN M.S., MIYAKE H. & TAKEOKA Y., 2002 - Effects of exogenous glycinebetaine on growth and ultrastructure of salt-stressed rice seedlings (*Oryza sativa* L.), *Plant Prod. Sci.* 5: 33–44.
186. RAVAGNANI A., ABBERTON M.T. & SKØT L., 2012 - Development of genomic resources in the species of *Trifolium* L. and its application in forage legume breeding. *Agronomy*, 2, 116–131.
187. RAVEN P.H., EVERT R.F. & EICHLORN S.E., 2000 - Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.
188. REDONDO-GÓMEZ S., MATEOS-NARANJO E., CAMBROLLÉ J., LUQUE T., FIGUEROA M.E. & DAVY A.J., 2008 - Carry-over of differential salt tolerance in plants grown from dimorphic seeds of *Suaeda splendens*. *Ann. Bot.* 102, 103–112. doi: 10.1093/aob/mcn069.
189. REYNOLDS M.P., CALDERINI D.F., CONDON A.G. & RAJARAM S., 2001 - Physiological basis of yield gains in wheat associated with LR19 translocation from *Agropyronelongatum*. *Euphytica* 119, 137– 141.
190. RITIKA B. & UPTAL D., 2014 - Bio-fertilizer a way towards organic agriculture: A Review. *Academic Journals.* 8(24):2332-42.
191. RODRÍGUEZ-KESSLER M., ALPUCHE-SOLÍS A.G., RUIZ O.A. & JIMÉNEZ-BREMONT J.F., 2006 - Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Regulation* 48.
192. ROSS J.P. & HARPER J.A., 1970 - Effect of Endogone mycorrhiza on soybean yields. *Phytopathology*, 60. 1552.
193. ROZE I., 2003 - Genus *Trifolium* L. in flora of Latvia. *Acta Biologica Univ. Daugavpil.* 3 (1), 33–40.
194. ROZE I., 2007 - Âboliða *Trifolium* L. ïints Latvijas florâ [Clover genus *Trifolium* L. in flora of Latvia]. *Latvijas Veïetâcija*, 13, 17–32 (in Latvian).
195. RUIZ-LOZANO J., PORCEL R., AZCÓN C. & AROCA R., 2012 - Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *Journal of Experimental Botany* 63: 4033–4044.
196. RUSSELLE M., 2001 - Alfalfa. *American Sciences* 89: 252-259.

197. **SABUDAK T. & GULER N., 2009** - *Trifolium L.* A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytother. Res.* 23, 439–446.
198. **SADASIVAM S. & MANICKAM A., 1996** - Biochemical Methods, 2nd ed.Int. Publ. Ltd., New Delhi.
199. **SAID BOUDAA B. & ABDELMAJID HADDIOUB., 2011** - effet du stress salin sur la germination de quelques espèces du genre atriplex Revue <<Nature & technologie>>.n° 05/Juin 2011.
200. **SALAMA S., TRIVEDI S., BUSERA M., Aafa A.A., GARAB G. & ERDEI L., 1994** - Effects of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplasts structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance, *J. Plant Physiol.* 144: 241–247.
201. **SANNAZZARO A.I., ECHEVERRÍA M., ALBERTÓ E.O., RUIZ O.A. & MENÉNDEZ A.B. 2007** - Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant physiology and biochemistry* 45: 39–46.
202. **SCHOENEBERGER M.M., VOLK R.J. & DAVEY C.B., 1989** - Factors influencing early performance of leguminous plants in forest soils. *Soil Science Society of America Journal*, 53: 1429-1434.
203. **SCHÜBLER A., SCHWARZOTT D. & WALKER C., 2001** - A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological research.* 105: 1413-1421.
204. **SEGUEL A., CUMMING J.R., KLUGH-STEWART K., CORNEJO P. & BORIE F., 2013** - The role of arbuscular mycorrhizas in decreasing aluminium phytotoxicity in acidic soils: a review. *Mycorrhiza* 23, 167–183.
205. **SERRAJ R., ROY G. & DREVON J.J., 1994** - Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion, *Physiol. Plant.* 91: 161–168.
206. **SERRAJ R., VASQUEZ-DIAZ H. & DREVON J.J., 1998** - Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion, and distribution in soybean, common bean, and alfalfa, *J. Plant Nutr.* 21: 475–488.
207. **SHARIFI M., GHORBANLI M. & EBRAHIMZADEH H., 2007** - Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi. *Journal of plant physiology* 164: 1144–1151.

208. SHAUG SUEPEA., LU CHIHSIN., KING WENWEI., BUU RUEYHSHIUNG. & LIN JENGBIN., 2000 - Forage production and silage making for berseem clover. *J. Taiwan Livestock Res.*, 33 (1): 105-110.
209. SHENG M., TANG M., CHEN H., YANG B., ZHANG F. & HUANG Y., 2008 - Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* 18: 287–296.
210. SILVIA N., VENDRAME S.W.A., CRANE J.H., PEREIRA M.C., COSTA A. & REIS S.T., 2015 - Variability in reproductive traits in *Jatropha curcas* L. accessions during early developmental stages under warm subtropical conditions. *Glob Chang Biol Bioenergy*, 7: 122-134.
211. SINGH R., ADHOLEYA A. & MUKERJI K.G., 2000 - Mycorrhiza in control of soil borne pathogens. *Mycorrhizal Biology*: 173–196.
212. SMITH S.E. & READ D., 2008 - Mycorrhizal Symbiosis, third ed. Academic Press, New York.
213. SMITH S.E. & READ D.J., 1997 – Mycorrhizal symbiosis. Second edition. Academic Press; Harcourt Brace and Compan y Publishers, 605p.
214. SMITH S.E. & SMITH F.A., 2012 - Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104: 1-13.
215. SMITH S.E., JAKOBSEN I., GRØNLUND M. & SMITH F.A., 2011 - Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant physiology*, 156: 1050-1057.
216. SMOLIAK S., DITTERLINE R.L., SCHEETZ J.D., HOLZWORTH L .K., SIMS J.R., WIESNER L.E., BALDRIDGE D.E. & TIBKE G.L., 2006 - Berseem Clover (*Trifolium alexandrinum*). Montana State University, Animal & Range Sciences Extension Service, Forage extension program, Bozeman, USA.
217. SPRENT J I., 2001 - Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
218. St-ARNAUD M., HAMEL C., CARON M. & FORTIN J., 1995 - Endomycorrhizes VA et sensibilité des plantes auxmaladies: synthèse de la littérature et mécanismes d’interaction potentiels, in: Fortin J, Charest C,

- Piché, Y (Eds.), La symbiose mycorhizienne, état des connaissances, Orbis Publishing, pp. 51–87.
- 219. STEINER J.J., ROBINSON W.A., LISTON A. & TAYLOR N.L., 1997** - ITS and RAPD phylogenetic hypotheses and the ecological distributions of North American *Trifolium* L. (Fabaceae). *American Journal of Botany* 84: 235-236.
- 220. SUTTIE J.M., 1999** - *Trifolium alexandrinum* L.. Grassland Index. A searchable catalogue of grass and forage legumes. FAO, Rome, Italy.
- 221. SWATHI V., 2010** - The use and benefits of bio-fertilizer and biochar on agricultural soils unpublished B.Sc. thesis. Department of Chemical and Biological Engineering. Chalmers University of Technology Goteborg Sweden. 20-4.
- 222. TALAAT N.B. & SHAWKY B.T., 2014** - Protective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants exposed to salinity. *Environmental and Experimental Botany* 98: 20–31.
- 223. TAUSKY H.H. & SHORR E., 1963** - A micro-colorimetric method for the determination inorganic phosphorus. *The journal of biological chemistry*. 202: 675-685.
- 224. TROSYNSKA A., ESTRELLA I., LOPEZ-AMORES M.L. & HERNANDEZ T., 2002** - Antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) seed coat acetone extract. *LWT Food Sci Technol.* 35:158–164. doi: 10.1006/fstl.2001.0831.
- 225. UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER., 2010** - Physiologie végétale. Catalase et Peroxydase.
- 226. UVA R.H., JOSEPH C. & DITOMASO J., 1997** - *Weeds of the Northeast*. Ithaca. Cornell University Press, NY, 236–238.
- 227. VANCE C.P., GRAHAM P.H. & ALLAN D.L., 2000** - Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. In: *Nitrogen fixation: from Molecules to crop productivity*. Kluwer Academic Publishers, New York. pp. 839-867.
- 228. VESSEY J.K., 2003** - Plant growth promoting Rhizobacteria as bio-fertilizers. *Journal of Plant and Soil*. 225(43):571-86.

229. **VILLAX E.J., 1963** - La culture des plantes fourragères dans la région méditerranéenne occidentale. Les cahiers de la recherche agronomique N°17. Institut National de la Recherche Agronomique, Rabat.
230. **VOYSEY C.R., WHITE D., DUDAS W.R. & EALING R.D., 1994** - *Agrobacterium* mediated transformation of white clover. *Plant Cell*, **13**, 309–314.
231. **WANG T.L., DOMONEY C., HEDLEY C.L., CASEY R. & GRUSAK M.A., 2003** - Can we improve the nutritional quality of legume seeds. *Plant Physiology* 131: 886–891.
232. **WANG Y. & NIL N., 2000** - Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 75, 623-627.
233. **WEHNER J., ANTUNES P.M., POWELL J.R., MAZUKATOW J. & RILLIG M.C., 2010** - Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity? *Pedologia* 53: 197-201.
234. **WHIPPS J.M., 2004** - Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian journal of botany*, 82: 1198-1227.
235. **WU N., ZHANG S., HUANG H. & CHRISTIE P., 2008** - Enhanced dissipation of phenanthrene in spiked soil by arbuscular mycorrhizal alfalfa combined with a non-ionic surfactant amendment. *Science of the Total Environment* **394**: 230–236.
236. **WU Q.S., HE X.H., ZOU Y.N., LIU C.Y., XIAO J. & LI Y., 2012** - Arbuscular mycorrhizas alter root system architecture of Citrus tangerine through regulating metabolism of endogenous polyamines. *Plant Growth Regulation* **68**: 27–35.
237. **YEO A.R., 1998** – Molecular biology of salt tolerance in the context of whole. *Plant Physiology.J.Exp.Bot.* 49: 915-929.
238. **YOKOI S., QUINTERO F.J., CUBERO B., RUIZ M.T., BRESSAN R.A., HASEGAWA P.M. & PARDO J.M., 2002** - Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant Journal*, 30 : 529-539.
239. **YOOYONGWECH S., PHAUKINSANG N., CHA-UM S. & SUPAIBUIWATANA K., 2013** - Arbuscular mycorrhiza improved growth

- performance in *Macadamia tetraphylla* L. grown under water deficit stress involves soluble sugar and proline accumulation. *Plant Growth Regulation* **69**: 285–293.
- 240. ZAHNAN H.H., 1999** - Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 968-989.
- 241. ZEVEN A.C., 1991** - Four hundred years of cultivation of Dutch white clover landraces. *Euphytica* **54**: 93-99.
- 242. ZHU H., CHOI H.K., COOK D.R. & SHOEMAKER R.C., 2005** - Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology* **137**: 1189-1196.
- 243. ZHU X., SONG F. & XU H., 2010** - Influence of arbuscular mycorrhiza on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of maize plants under temperature stress. *Mycorrhiza* **20**, 325–332.
- 244. ZOHARY M. & HELLER D., 1984** - The genus *Trifolium*. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem.
- 245. ZOHARY M., 1972** - Origins and evolution in the genus *Trifolium*. *Botaniska Notiser* **125**: 501-511.

Annexes

- 1. Acétone pure à 90% :** Pour 100 ml : 90 ml acétone pure + 10 ml d'eau distillée.
- 2. Réactif de Bradford :** Bleu de Coomassie G250 100mg ; Ethanol à 95% 50mL ; Acide phosphorique (H_3PO_4) à 85% 100mL ; dH_2O QSP 1L (à conserver à +4°C à l'abri de la lumière).
- 3. Réactif sulfomolybdique:** Pour 100 ml: 8g molybdate d'ammonium + 40 mL d'eau distillée et dissoudre (tiédir éventuellement puis laisser refroidir) après ajouter 40 mL d'eau distillée + 24 mL acide sulfurique.
- 4. Solution de Ninhydrine :** dans la hotte mesuré 200 mg de ninhydrine et ajoute 100 ml de propanol.
- 5. Solution de permanganate de potassium :** 2.7 de permanganate de potassium et 270 d'eau distillée.
- 6. Solution de proline pure :** 40 mg de proline pure → 50 ml d'eau distillée ; Prendre 1 ml et ajouter 25 ml d'eau distillée ([] = 0.08 mg/ 25 ml).
- 7. Solution mère (stock) de sérumalbumine (BSA) :** à 2g/L (2mg/mL) ou obtenue à partir de solubilisation de BSA lyophilisée dissoute dans de l'eau distillée.

Résumé

Résumé :

De faibles travaux sont consacrés à l'inoculation par les champignons arbusculaires (CMA), notamment sur des sols naturellement salins. L'objectif de ce travail est d'étudier la contribution de l'inoculation par les champignons arbusculaires autochtones et commerciaux sur le développement végétatif de deux variétés de Trèfles (*Trifolium alexandrinum L.* et *Trifolium repens L.*) cultivé sur des sols salins prélevés des régions semi-arides. Les résultats obtenus ont montré une réduction des taux de proline plus significative avec l'inoculum autochtone signifiant un niveau de stress plus faible. Les deux types d'inoculum ont montré une absorption des ions K^+ et du phosphore accompagné d'une réduction des ions Na^+ et Cl^- . D'un autre côté l'inoculum autochtone stimule plus significativement l'activité enzymatique par rapport à l'inoculum commercial. Les résultats de cette étude permettent d'entamer de nouvelles perspectives dans le domaine de la bio fertilisation des sols salins. Les souches autochtones sont une nouvelle innovation à exploiter.

Mets clés: CMA, inoculum commercial, inoculum autochtone, *Trifolium alexandrinum L.*, *Trifolium repens L.*, proline, la bio fertilisation.

Abstract:

There is little work being done on inoculation by arbuscular fungi (CMAs), especially on naturally saline soils. The objective of this work is to study the contribution of inoculation by native and commercial arbuscular fungi to the vegetative development of two varieties of clover (*Trifolium alexandrinum L.* et *Trifolium repens L.*) grown on saline soils from semi-arid regions. The results obtained showed a more significant reduction in proline levels with native inoculum indicating a lower stress level. Both types of inoculum showed absorption of K^+ ions and phosphorus accompanied by a reduction in the Na^+ and Cl^- ions. On the other side, the native inoculum stimulates enzymatic activity more significantly compared to commercial inoculum. The results of this study lead to new perspectives in the field of bio fertilization of saline soils. Native strains are a new innovation to be exploited.

Key-words: CMAs, native inoculum, commercial inoculum, *Trifolium alexandrinum L.*, *Trifolium repens L.*, proline, bio fertilization.

ملخص:

القليل من العمل الذي تم القيام به على التلقيح عن طريق الفطريات (CMA)، وخاصة على التربة المالحة بشكل طبيعي. الهدف من هذا العمل هو دراسة مساهمة التلقيح من قبل الفطريات الأصلية والتجارية في التنمية النباتية من نوعين من البرسيم (*Trifolium alexandrinum L.* et *Trifolium repens L.*) نمت على التربة المالحة من المناطق شبه القاحلة. وأظهرت النتائج انخفاضا أكثر أهمية في مستويات البرولين مع التلقيح الأصلي مما يشير إلى انخفاض مستوى الإجهاد. وأظهر كلا النوعين من التلقيح امتصاص أيونات K^+ والفوسفور، يرافقه انخفاض في أيونات Na^+ و Cl^- ومن ناحية أخرى، فإن التلقيح الأصلي يحفز النشاط الإنزيمي بشكل أكبر مقارنة بالتلقيح التجاري. تسمح لنا نتائج هذه الدراسة ببدء آفاق جديدة في مجال الإخصاب البيولوجي للتربة المالحة. والسلالات الأصلية هي ابتكار جديد ينبغي استغلاله.

الكلمات الدالة: CMA ، اللقاح الأصلي، اللقاح التجاري، *Trifolium alexandrinum L.*، *Trifolium repens L.* ، البرولين، الإخصاب البيولوجي.