



MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDE
MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES
GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE

Thème :

**Evaluation Agro-physiologique et biochimique de 154 familles
demi-frères de luzerne pour la tolérance au stress hydrique
estival sous conditions de champ de la région du Haouz.**

Préparé par :

Yahya LAHRIZI

Au laboratoire de :

Amélioration Génétique des Plantes
Institut National de la Recherche Agronomique de Marrakech

Encadré par :

Dr. A. BOUIZGAREN, Pr. K. MIKOU

Présenté le 25 juin 2015 devant le jury composé de :

Pr. MIKOU K.	FST-Fès	Présidente
Pr. AMRANI J. K.	FST-Fès	Examineur
Pr. LAZRAK A.	FST-Fès	Examineur
Pr. LOUAHLIA S.	F.P-Taza	Examineur

Année Universitaire : 2014/2015

Faculté des Sciences et Techniques Fès

B.P. 2202, Route d'Imouzzer FES

☎ 212 (535) 60 80 14 – 212 (535) 60 96 35 📠 212 (535) 60 82 14 www.fst-usmba.ac.ma

DEDICACE

A mes chers parents

A mes chères frères et sœurs

A ma grande famille

A mes chers amis

A mes chers professeurs

A mes chers collègues

REMERCIEMENT

C'est avec beaucoup de reconnaissance que j'adresse mes chaleureux remerciement à mon encadrant Dr. Abdelaziz BOUIZGAREN pour avoir suivi et dirigé ce travail. Ses conseils, ses orientations ainsi que ses critiques qui m'ont été un apport précieux.

Mes sincère remerciements vont aussi à mon Co-encadrant Pr. K. MIKOU pour son encouragement, son aide et son soutien, je lui exprimé mon profonde gratitude pour l'intérêt qu'il a porté pour ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer le mémoire de mon stage de fin d'étude : Pr. LOUAHLIA S., Pr. LAZRAQ A. et Pr. AMRANI J. K.

Mes remerciements s'adressent également à M. MOURADI Doctorant à la Faculté sciences et techniques de nous avoir orienté, aidé, soutenir, encouragé pendant tout au long de mon stage. Et je le remercié encore pour leurs conseils judicieux et sa qualité humaine.

Je tiens à remercié aussi le chef du domaine expérimental de SAADA Marrakech pour son aide et son encouragement.

Je remercié également tous les membres de l'équipe de recherche du laboratoire d'amélioration génétique des plantes et qualité, pour leurs soutiens et de leurs encouragements.

Mes sentiments les plus profonds et mes remerciements infinis à mes amis(es) et à mes collègues pour leurs aide et leurs encouragements.

Enfin, mes remerciements vont à tous les membres de ma famille pour leur soutien moral et leur encouragement affectueux. Et à tous ceux qui m'ont aidé, d'une manière ou d'une autre, dans la réalisation de ce travail.

RESUME

154 familles demi-frères issues de la descendance d'un croisement entre trois cultivars de luzerne (Mumuntanas, Sardi et Erfoud) ont été évaluées pour leur tolérance au stress hydrique estival dans les conditions du champ de la région du Haouz. L'essai a été soumis d'abord à un déficit hydrique modéré au cours des mois d'Avril, et de Mai, suivi d'un déficit hydrique sévère au début de juillet jusqu'à mi-septembre dont l'irrigation a été arrêtée tout au long de cette période.

L'évaluation de l'essai a porté sur certains paramètres agronomiques, physiologiques et biochimiques liées à la tolérance au stress hydrique. Les résultats obtenus ont montré qu'il y a existence des différences significatives entre les familles demi-frères de luzerne testées vis-à-vis de la majorité des paramètres agronomiques, physiologiques et biochimiques étudiés. En termes de taux de mortalité environ 10% des familles demi-frères ont une bonne persistance au stress estival. Cependant 3,2% de familles demi-frères ont montré un bon potentiel fourrager ($>1,8 \text{ kg/m}^2$) vis-à-vis du rendement en matière verte. Ces deux paramètres ont été négativement corrélés.

Egalement nous avons noté que le rendement en matière verte a été positivement corrélé aux teneurs des feuilles en proline, en sucres solubles, et en chlorophylle. Quant aux paramètres physiologiques, le rendement en matière verte a été corrélé à la conductance stomatique et à la fluorescence chlorophyllienne. Par conséquent, ces paramètres constituent des indicateurs pour la sélection des familles demi-frères ayant un bon potentiel fourrager comme parent pour la constitution d'une variété synthétique. Cette dernière pourrait valoriser les zones arides qui souffrent de la rareté de l'eau d'irrigation.

Mots clés : *Medicago sativa* L., déficit hydrique estival, taux de mortalité, Paramètres agronomiques, paramètres physiologiques, paramètres biochimiques.

LISTE DES ABREVIATIONS

- **A** : Absorbance
- **ABA** : Acide Abscissique
- **ANOVA** : Analyse de la variance à deux critères
- **AOAC**: Association of Official Analytical chemists
- **CO₂** : Dioxyde de Carbone
- **d.d.l** : degré de liberté
- **DSH** : Déficit de saturation Hydrique
- **EUE** : Efficacité d'Utilisation de l'Eau
- **F0** : Fluorescence initiale
- **FAO** : Food and Agriculture Organization
- **Fm** : Fluorescence maximale
- **Fv** : Fluorescence variable
- **H3PO4** : Acide Orthophosphorique
- **HCl** : Acide Chloridrique
- **HT** : Hauteur de la Tige
- **MCE** : Méthanol Chloroforme-Eau
- **MF** : matière Fraiche
- **MFsat** : Matière fraîche en saturation
- **MS** : Matière Sèche
- **MV** : Matière Verte
- **pH** : Potentiel d'Hydrogène
- **ROS** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- **SAB** : Sérum Albuminé du Bovin
- **SF** : Surface Foliaire
- **TRE** : la Teneur Relative en Eau

LISTE DES FIGURES

- **Figure 1.** Morphologie de la plante de luzerne (*Medicago sativa* L.).
- **Figure 2.** Stades du développement de luzerne
- **Figure 3.** Plan de la première répétition de l'essai installé selon le modèle expérimental Alpha- Lattice.
- **Figure 4.** Plan des parcelles élémentaires
- **Figure 5.** Application du stress hydrique au niveau de l'essai
- **Figure 6.** Distribution des familles de luzerne selon leur rendement en matière verte.
- **Figure 7.** Distribution des familles de luzerne selon leur taux de mortalité après application du stress hydrique estival.
- **Figure 8.** Distribution des familles de luzerne selon la hauteur de leur tige principale.
- **Figure 9.** Distribution des familles demi-frères étudiées selon leur surface foliaire.
- **Figure 10.** Distribution des familles demi-frères étudiées selon leur déficit de saturation hydrique.
- **Figure 11.** Distribution des familles demi-frères selon leur potentiel hydrique.
- **Figure 12.** Distribution des familles demi-frères étudiées selon leur conductance stomatique
- **Figure 13.** Distribution des familles demi-frères de luzerne selon leur rendement quantique.
- **Figure 14.** Distribution des familles demi-frères étudiées selon la teneur de leurs feuilles en chlorophylle.
- **Figure 15.** Distribution des familles demi-frères selon la teneur de leurs feuilles en protéine totaux.
- **Figure 16.** Distribution des familles demi-frères selon l'accumulation de la proline au niveau de leurs feuilles
- **Figure 17.** Distribution des familles demi-frères selon l'accumulation des sucres solubles au niveau de leurs feuilles.

LISTE DES TABLEAUX

- **Tableau 1.** Origine des cultivars utilisés en croisement
- **Tableau 2.** Analyse de la variance (ANOVA) pour les paramètres agronomiques étudiés
- **Tableau 3.** Corrélation entre les paramètres agronomiques étudiés
- **Tableau 4.** Analyse de la variance (ANOVA) pour les paramètres physiologiques étudiés
- **Tableau 5.** Corrélation entre les paramètres physiologiques étudiés.
- **Tableau 6.** Corrélation entre les paramètres physiologiques et le rendement en matière verte et le taux de mortalité des plantes
- **Tableau 7.** Analyse de la variance (ANOVA) pour les paramètres biochimiques étudiés
- **Tableau 8.** Corrélation entre les paramètres biochimiques étudiés
- **Tableau 9.** Corrélation entre les paramètres biochimiques et le rendement en matière verte et taux de mortalité de plantes après application du stress hydrique
- **Tableau 10.** Les familles demi-frères qui semblent à être sélectionnés

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I. Présentation de la culture de la luzerne.....	4
I-1 Généralités	4
I-2 Caractéristiques botaniques	4
I-3 Morphologie	4
I-4 Cycle de développement.....	5
I-5 Exigences pédoclimatiques.....	6
I-6 Importance agronomique	6
I-7 Importance nutritive	7
I-8 Tolérance aux contraintes abiotiques.....	7
II. la contrainte hydrique.....	8
II-1 Généralités.....	8
II-2 Effet du déficit hydrique sur la luzerne	8
II-2 -1 Effet sur la germination des graines.....	8
II-2-2 Effet sur la croissance	9
II-2-3 Effet sur le rendement.....	9
II-2-4 Effet sur la photosynthèse	10
II-2-5 Effet sur les membranes cellulaires	11
II-2-6 Effet sur le métabolisme de la plante	11
II- 3 Mécanisme de tolérance à la sécheresse	11
II-3-1 Maintien du potentiel hydrique faible.....	11
II-3-2 L'ajustement osmotique.....	12
II-3-3 Les adaptations biochimiques	12
II-3-3-1 Accumulation de la proline.....	12
II-3-3-2 Accumulation des sucres solubles	12
II-3-3-3 Synthèse des protéines.....	13
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES.....	14
I. Protocole expérimental de l'essai au champ.....	15
I-1 Site d'installation de l'essai	15
I-2 Matériel végétal	15
I-3 Germination de semences	15

I-4 Installation de l'essai	16
I-5 Application du stress	17
II. Les paramètres évalués.....	18
II-1 Paramètres agronomiques	18
a.Hauteur de la tige (HT).....	18
b.Surface foliaire (SF)	18
c.Matière verte (MV).....	18
d.Taux de mortalité	18
II-2 Les paramètres physiologiques	18
a.Déficit de saturation hydrique	18
b.Potentiel hydrique	19
c.Conductance stomatique.....	19
d.Fluorescence chlorophyllienne.....	19
II-3 Paramètres biochimiques.....	20
a.Teneur en chlorophylle	20
b.Dosage des protéines solubles.....	20
c. Dosage de la proline et des sucres solubles.....	20
III.analyse statistique.....	21
CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION.....	22
I. Caractérisation de la variabilité des paramètres agronomiques.....	23
I-1 Analyse de la variance	23
I-2 Rendement en matière verte (MV)	23
I-3 Taux de mortalité des plantes sous stress hydrique estival.....	24
I-4 Hauteur de la tige principale (HT).....	26
I-5 Surface foliaire (SF)	27
I-6 Corrélation entre les paramètres agronomiques	28
II.Caractérisation de la variabilité des paramètres physiologiques.....	29
II-1 Analyse de la variance.....	29
II-2 Déficit de saturation hydrique (DSH)	29
II-3 Potentiel hydrique	30
II-4 Conductance stomatique.....	31
II-5 Fluorescence chlorophyllienne.....	32
II-6 Corrélation entre les paramètres physiologiques.....	33
III.Caractérisation de la variabilité des paramètres biochimiques.....	34

III-1 Analyse de la variance	34
III-2 Teneur en chlorophylle	34
III-3 Teneur en protéines	35
III-4 Teneur en proline	36
III- 5 Teneur en sucres solubles	37
III- 6 Corrélation entre les paramètres biochimiques	38
IV. Les familles demi-frères à sélectionnées	40
CONCLUSION	41
PERSPECTIVES	43
REFERENCES	44
ANNEXES	52

INTRODUCTION

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est la légumineuse fourragère la plus répandue et la plus cultivée dans le monde, grâce à sa haute qualité nutritive, sa teneur élevée en protéines, et ses effets sur la fertilité du sol (Campiglia *et al.* 1999; Huyghe, 2003). Elle est cultivée essentiellement pour une exploitation en fauche, sur des sols non acides et non hydromorphes. Elle est exploitée pour sa partie aérienne riche en protéines et destinée à l'alimentation animale (Julier et Huyghe, 2010). Grâce à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique, la luzerne peut s'adapter aux situations de faibles ressources en azote minéral du sol. Ce qui lui confère un double intérêt économique par une réduction de la fertilisation azotée et par conséquent des engrais azotés de synthèse associée à une production de protéines, et un intérêt écologique par la limitation de lixiviation des nitrates vers la nappe phréatique.

Au Maroc, la culture de luzerne occupe plus de 100 000 ha, soit environ 22% de la superficie totale consacrée aux cultures fourragères (Bouizgaren *et al.*, 2011). Sa contribution aux unités fourragères produites se situe à environ 50% du total. Son importance réside dans son haut potentiel de production, sa grande qualité et sa souplesse d'exploitation (affouragement en vert, fanage, pâturage, déshydratation, ensilage) (Bouizgaren, 2007).

Cependant, les besoins en eau de la luzerne sont élevés et se situent aux alentours de 10 000 m³/ha/an (Bouizgaren, 2007). Actuellement, les ressources hydriques sont de plus en plus rares en raison de la succession des années de sécheresse associée à une grande variation annuelle des précipitations et leur distribution (Bouizgaren *et al.*, 2011). Ce qui limite la productivité des cultures et leur persistance. Ce déficit en eau est crucial entre les mois de Mai et Septembre qui est la période de pleine production de la luzerne. En outre, au cours de cette période l'efficacité d'utilisation de l'eau par cette culture est très faible. Par conséquent, la productivité de la luzerne dépend de sa capacité à tolérer le déficit hydrique chronique estival.

Dans ce contexte, cette étude vise à sélectionner au sein de 154 familles demi-frères issues de la descendance d'un croisement entre trois cultivars de luzerne (Mumuntanas, Sardi et Erfoud) connus pour leur tolérance au déficit hydrique estival. Les familles à sélectionner devrait présenter une persistance en conditions de sécheresse, surtout en été lorsque la disponibilité de l'eau est très critique en raison de la forte demande pour l'irrigation imposée par la concurrence avec des cultures irriguées plus rentables. Ces familles vont constituer les parents pour la création d'une variété synthétique. La principale caractéristique de cette

dernière est la tolérance au stress estival (dormance estivale) avec une efficacité d'utilisation de l'eau (EUE) et de la production fourragère maximale.

CHAPITRE 1 :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation de la culture de la luzerne

I-1 Généralités

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est l'une des légumineuses fourragères qui représentent une bonne source d'alimentation du cheptel riche en protéines, en fibres et en énergie. Par conséquent, elle est à la base de la production du lait et de la viande (Russelle, 2001). C'est une plante pérenne herbacée fourragère allogame, entomophile, tétraploïde avec un nombre chromosomique de base $n=8$ dont le fruit est une gousse (Caratini, 1984). Elle possède un système racinaire pivotant, très développé et profond (jusqu'à deux mètres) permettant de fragmenter le sol et d'améliorer sa structure (Thiébeau *et al.*, 2003). La racine porte des petits organes dites nodosités ; où a lieu la fixation symbiotique de l'azote avec *Rhizobium meliloti* (Awad *et al.*, 2011). Cette caractéristique permet à la luzerne, contrairement aux autres cultures, d'assurer sa nutrition azotée.

I-2 Caractéristiques botaniques

La luzerne appartient à la famille des Fabaceae, sous-famille des Papilionaceae, tribu des Trifolieae et genre *Medicago*. La luzerne cultivée au Maroc appartient à l'espèce (*Medicago sativa* L.). Dans d'autres régions plus septentrionales, *M. falcata* est cultivée aussi sous l'appellation de luzerne. Selon la classification classique des plantes, proposée par Carl Von Linné (1753), la position systématique de la luzerne (*Medicago sativa* L.) est la suivante:

- Embranchement : Anthophytes
- Classe : Dicotylédones
- Famille : Fabacées
- Sous famille : Papilionaceæ
- Tribu : Trifolieae
- Genre : Medicago

I-3 Morphologie

La luzerne a une racine principale pivotante très longue et des racines secondaires plus ou moins ramifiées. La tige porte des feuilles alternes trifoliées finement dentées au sommet. Elle présente des fleurs hermaphrodites de couleur violette, groupées en inflorescence sous forme de grappe courte et pyramidale comportant 15 à 30 fleurs (Birouk *et al.*, 1997) (figure 1).

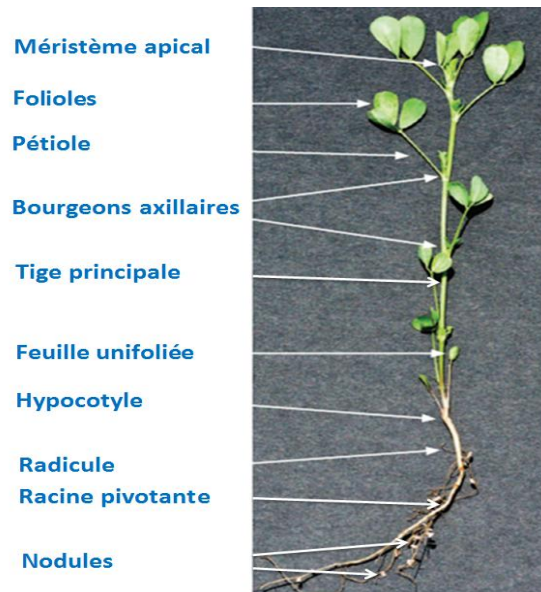


Figure 1. Morphologie de la plante de luzerne (*Medicago sativa* L.) (Undersander *et al.*, 2011).

I-4 Cycle de développement

La germination de *M. sativa* est épigée. Dès que les cotylédons sont émis, la première feuille est unifoliée (figure 2). Les feuilles suivantes sont trifoliées dentées et rattachées à la tige par un pétiole. Ainsi, la première tige grandit en produisant des feuilles alternées en général de type trifoliées. Pendant le développement de la plante, il y a croissance du bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée pour donner une tige secondaire. Après, deux autres tiges secondaires démarrent à sa suite depuis le niveau des cotylédons. Le nombre de tiges secondaires varie en fonction de types de luzerne. Celui de type non dormant produit plus de tiges secondaires que le type dormant dont la croissance est stoppée en hiver.

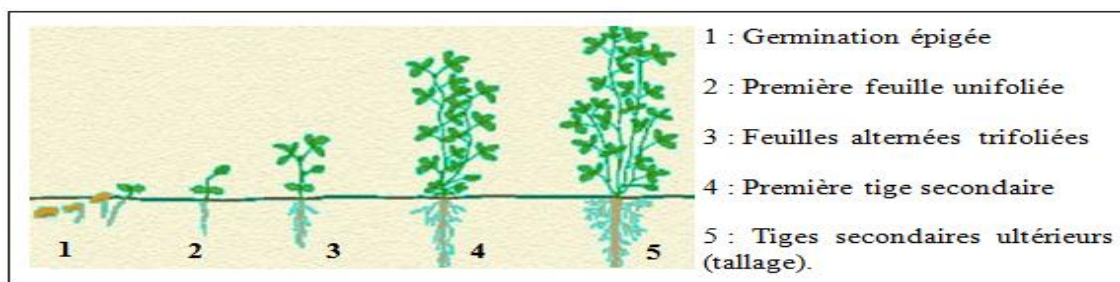


Figure 2. Stades du développement de luzerne (Mauriès, 1994).

I-5 Exigences pédoclimatiques

La luzerne affectionne les sols secs et neutres de pH compris entre 6,5 et 7,2 (Penhouet, 2008). Les semis se développent rapidement au-dessus de 20°C, une température qui constitue par ailleurs une moyenne optimale de croissance pour la plante. La croissance est en effet fortement réduite en-dessous de 10°C et au-dessus de 35°C (Craufurd *et al.*, 2003). Pour une bonne germination, les graines de luzerne ont besoin d'un sol humide sans lequel la croissance des racines et de la plante serait réduite. Le système racinaire profond de la luzerne lui permet de bien supporter la sécheresse (Collin *et al.*, 2003). Compte tenu de la petite taille des graines de luzerne, un travail du sol fin en surface est nécessaire. Il permet un bon contact graine/sol et favorise les remontées capillaires d'eau (Collin *et al.*, 2003).

Le froid peut entraîner plusieurs dommages telles que l'altération de la stabilité membranaires, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la dénaturation des protéines et l'accumulation des produits toxiques (Zhu, 2001; Shao *et al.*, 2008).

L'eau constitue le principal facteur limitant la production de la luzerne. La quantité d'eau à apporter varie largement en fonction des conditions édapho-climatiques et du système d'irrigation. Environ 800 à 1000 m³ d'eau/ ha sont nécessaires pour produire 1 tonne de matière sèche (Bouizgaren, 2007).

I-6 Importance agronomique

L'intérêt agronomique majeur de la luzerne consiste dans la grande production fourragère en zone sèche et dans la diminution de l'utilisation d'engrais azotés. Grâce à leurs propriétés fixatrices d'azote, ce qui correspond à une économie appréciable de consommation d'énergie fossile génératrice de gaz à effet de serre (Erice *et al.*, 2010). Et leurs racines pivotantes et profondes permettent d'améliorer la structure du sol et aussi de limiter la perte de nitrate par lessivage et de limiter les risques d'érosion (broderick, 2001). La luzerne possède une grande capacité à se ressemer naturellement d'une année à une autre. Cette propriété peut aboutir à une installation pérenne adaptée aux aléas climatiques des zones méditerranéennes diminuant ainsi le phénomène d'érosion des sols. Par ailleurs, de nombreuses espèces et sous-espèces de *Medicago* présentent aussi des caractères d'intérêt agronomique, tels que la tolérance au pâturage (capacité d'enracinement et de repousse), la tolérance à la sécheresse, à la salinité et aux maladies (Bouizgaren, 2007).

I-7 Importance nutritive

Comme toutes les légumineuses, la luzerne possède beaucoup d'avantages telle que, la haute qualité d'alimentation (Mo *et al.*, 2011). Elle permet une économie importante d'engrais azotés ce qui correspond à une économie appréciable de consommation d'énergie fossile génératrice de gaz à effet de serre (Lemaire, 2006).

La luzerne fournit un fourrage riche en protéine, en matières azotée digestibles et en vitamines (Janati, 1990 ; Chaibi, 1999). En effet, les parties aériennes récoltées présentent une haute valeur protéique (environ 3 à 3,5 tonnes de protéines par hectare et par an), loin devant celles des protéagineux et oléo-protéagineux tels que le pois (*Pisum sativum L.*) et le colza (*Brassica napus L.*) (Huyghe, 2003). Ainsi, le fourrage vert contient une bonne quantité de vitamine C (0,5%). Elle est très riche en acides aminés, mais aussi en minéraux dont le calcium, le fer, le phosphore, le zinc, ou le cuivre ainsi qu'en vitamine A et K. En plus, elle constitue une source importante de chlorophylle (Schoutteten, 2004). Le glucose, le fructose et le saccharose sont les glucides solubles essentiels et représentent 5 à 13 % de la matière sèche selon le stade de croissance, le cycle de récolte et le génotype (Bouizgaren, 2007).

I-8 Tolérance aux contraintes abiotiques

Dans la majorité des sols cultivés, la productivité végétale est limitée par plusieurs contraintes abiotiques dont les plus importantes sont le déficit hydrique et la salinité (Bouizgaren *et al.*, 2011 ; Farissi *et al.*, 2013 ; Latrach *et al.*, 2014). Ces contraintes constituent des facteurs majeurs limitant considérablement la productivité agricole en général et celle de la luzerne en particulier sur une superficie d'environ 40% de la surface terrestre, notamment dans la région méditerranéenne (FAO, 1988). Actuellement près de 25% des terres irriguées au Maroc sont confrontés au problème de la salinité qui affecte particulièrement les zones arides et semi-arides (Hassani *et al.*, 2008). Au niveau de ces écosystèmes difficiles, les populations locales de la luzerne sont largement utilisées en raison de leur tolérance et leur adaptation aux différentes conditions pédoclimatiques marocaines (Bouizgaren, 2007).

II. La contrainte hydrique

II-1 Généralités

Un stress hydrique peut se produire aussi bien sous l'effet d'un excès que d'un manque d'eau. Le stress provoqué par l'excès d'eau induit habituellement une réduction de l'apport d'oxygène qui limite à son tour la respiration, l'absorption des nutriments et d'autres fonctions racinaires cruciales. Le stress provoqué par un déficit hydrique est plus fréquent, de sorte que l'expression de stress de déficit hydrique est abrégée en stress hydrique (William et Charles-Marie, 2003).

Chez la luzerne, le stress hydrique est généralement considéré comme un facteur physique limitant de la production du fourrage. Il affecte la croissance, le développement, le rendement et la qualité des fourrages. Par exemple, il provoque chez la luzerne la diminution de 49% de la biomasse et une augmentation de 18% en rapport feuille/tige (Buxton, 2004). Trois principaux mécanismes réduisant le rendement des cultures suite à un déficit hydrique : (i) la réduction de l'absorption du rayonnement photosynthétique par le couvert végétal (ii) la diminution de l'efficacité d'utilisation du rayonnement (iii) la réduction de l'indice de récolte (Earl et Davis, 2003).

II-2 Effet du déficit hydrique sur la luzerne

La réponse des plantes aux stress, entre autre le déficit hydrique, dépend des caractéristiques de cette contrainte et celles de la plante. Un stress se définit par son intensité, sa durée, le nombre d'expositions ainsi que par son association à d'autres stress (Bray *et al.*, 2000). Chez la plante de la luzerne, le stress hydrique induit des modifications morphologiques, physiologiques, et moléculaires. La réponse à ce stress varie en fonction du stade de développement, des organes ou tissus touchés (Hamidi et Safarnejad, 2010).

II-2 -1 Effet sur la germination des graines

La germination est considérée comme un stade critique dans le cycle de développement de la plante. Elle conditionne l'installation de la plantule, son branchement sur le milieu, et probablement sa productivité ultérieure.

L'influence du stress hydrique sur la luzerne peut se manifester dès la germination. Au semis, l'insuffisance d'humidité du sol entraîne une germination des graines irrégulière et une

émergence non synchronisée des plantules, induisant un faible peuplement et un rendement réduit (Harris *et al.*, 2002; Kaya *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2011).

II-2-2 Effet sur la croissance

Un déficit hydrique, très modéré et ne présentant pas de symptômes flagrants, se traduit chez beaucoup d'espèces par une modification importante de l'architecture de la plante (Tardieu *et al.*, 2006).

La luzerne présente un système racinaire très profond est développé à la ligne. Par conséquent, elle a besoins des quantités importantes d'eau. Egalement, le déficit hydrique affecte fortement le développement de l'appareil végétatif, la hauteur et le nombre des tiges, le poids des racines, le taux de croissance des feuilles et le poids sec (Mauries, 1988).

Les travaux de Gis et Mott (1952), sur *Medicago sativa* ont montré que la croissance de la partie aérienne est réduite par le stress hydrique. La croissance des tiges est plus affectée que celle des feuilles. Le nombre de tiges par plant, l'élongation des tiges, le nombre d'entre-nœuds par tige, la longueur des entre-nœuds et des ramifications sont tous réduits par cette contrainte hydrique.

Selon Bhatt et Srinivasa, (2005), la réduction de la hauteur de la plante est associée à un déclin de l'élargissement cellulaire et une augmentation de la sénescence des feuilles. En effet, la croissance des plantes se fait à travers la division, l'élargissement, et la différenciation cellulaire, et implique des processus génétiques, physiologiques, écologiques et morphologiques, ainsi que leurs interactions complexes. La qualité et la quantité de cette croissance dépendent de ces processus qui sont affectées par le déficit hydrique.

La réduction de l'absorption de l'eau est le résultat de la diminution de la teneur en eau au niveau des tissus, et par suite, la perte de la turgescence. De même, le déficit hydrique réduit la photo-assimilation et les métabolites nécessaires à la division cellulaire. En conséquence, la mitose est réduite, l'élongation et l'expansion cellulaires des cellules entraînent la réduction de la croissance (Farooq *et al.*, 2009).

II-2-3 Effet sur le rendement

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'influence négative du déficit hydrique sur le rendement qui est déterminé par plusieurs processus physiologiques sensibles à type de stress.

Le rendement intègre une grande partie de ces processus physiologiques d'une façon complexe. Chebouti et *al.*, (2000) ont montré que quelle que soit la phase où le déficit hydrique a été imposé, une la réduction de la production des gousses et des graines est provoqué chez les populations des trois espèces de *Medicago*. Toutefois, cette réduction a été plus importante lorsque le stress est appliqué durant la phase floraison que durant la phase végétative. Des résultats similaires ont été obtenus par Chebouti et Abdelguerfi (2000) chez les populations de *Medicago truncatula* soumises à un déficit hydrique durant la phase végétative et la phase de floraison. Chez le *Medicago sativa*, Moise (1976) a souligné que sous déficit hydrique, la floraison est plus précoce et la hauteur de végétation est plus faible qu'en conditions humides. Ce même auteur a signalé également que le déficit hydrique pourrait augmenter le rapport feuilles/tige.

II-2-4 Effet sur la photosynthèse

La photosynthèse est le mécanisme par lequel les plantes chlorophylliennes utilisent de l'énergie lumineuse et à partir du dioxyde de carbone et d'eau, ils synthétisent leur propre matière organique nécessaire à leur croissance et leur développement. Le carbone (avec l'oxygène) étant le principal élément constitutif des plantes, représente environ 40% de leur matière sèche. On peut donc dire que la production de la matière sèche correspond au bilan de quantités de carbone assimilées par photosynthèse et des quantités restituées à l'atmosphère par respiration. Le CO₂ doit diffuser depuis l'atmosphère jusqu'aux chloroplastes, qu'on trouve dans les cellules foliaires, et au niveau desquels se déroule la quasi-totalité de la photosynthèse (Bethenod *et al.*, 1996).

L'effet majeur du stress hydrique est la réduction de la photosynthèse, qui se traduit par une diminution de la surface foliaire, une altération de l'appareil photosynthétique, une sénescence prématurée des feuilles et la réduction des assimilés (Wahid et Rasul, 2005).

L'effet du déficit hydrique se manifeste par une diminution de la conductance stomatique et donc de la fixation du CO₂ par les feuilles. La disponibilité du CO₂ pourrait conduire à des dommages de l'appareil photosynthétique (Cornic et Massacci, 1996).

La fermeture stomatique due à la sécheresse limite également la transpiration (la régulation des pertes en eau des feuilles par les stomates), et se traduit donc par un échauffement important des tissus foliaires. Des valeurs élevées de température foliaire provoquent une altération de l'appareil photosynthétique (Cornic et Massacci, 1996).

II-2-5 Effet sur les membranes cellulaires

Le déficit hydrique provoque un changement de l'état physique des membranes et peut réguler aussi l'activité des protéines membranaires intégrées, comme les aquaporines qui sont impliquées dans le contrôle du volume cellulaire ou l'homéostasie de la turgescence (Tyerman *et al.*, 2002).

II-2-6 Effet sur le métabolisme de la plante

Sous déficit hydrique l'acide abscissique (ABA) est sécrété en une forte concentration et l'activité de l'invertase acide vacuolaire est fortement corrélée avec la concentration de l'ABA xylémique (Trouverie *et al.*, 2003). Parmi les métabolites qui interviennent aussi au cours du stress hydrique il y a H_2O_2 qui agit comme un signal local ou systémique pour la fermeture des stomates et l'acclimatation des feuilles aux fortes irradiations (Pastori et Foyer, 2002). Mc Ainsh *et al.* (1996) ont trouvé que les applications exogènes de H_2O_2 ont induit une augmentation de la teneur en calcium cytosolique et par conséquence une fermeture stomatique.

II- 3 Mécanisme de tolérance à la sécheresse

De nombreux auteurs ont étudié les stratégies qui permettent aux plantes dans le climat méditerranéen de faire face avec succès à la plupart des conditions de stress comme la sécheresse estivale (Vitale *et al.* 2012). Les plantes ont développé une grande diversité de mécanismes morphologiques et physiologiques de tolérance à la sécheresse (Blum 1996; Peter & Roussos 2013).

II-3-1 Maintien du potentiel hydrique faible

La tolérance à la sécheresse repose sur la capacité des plantes à maintenir un potentiel hydrique relativement faible dans les tissus. Ce mécanisme a pour objectif de minimiser les pertes d'eau par transpiration foliaire et de maximiser l'absorption d'eau par les racines. Pour ce faire, les plantes réduisent leur transpiration par la fermeture des stomates et la diminution de la surface transpirante par enroulement foliaire. Aussi, elles augmentent leur absorption racinaire en augmentant la profondeur de leur système racinaire, sa densité et son degré de ramification (Turner *et al.*, 2001; Kavar *et al.*, 2007).

II-3-2 L'ajustement osmotique

L'ajustement osmotique est réalisé grâce à l'accumulation des solutés (principalement vacuolaire) conduisant à un maintien du potentiel de turgescence (Blum, 1989; Morgan et al., 1986). Ces solutés peuvent être par exemple : des sels de potassium (Ford et Wilson, 1981), des acides organiques (Pham Thi, 1976) et des sucres solubles. Ces derniers constituent souvent les composés majeurs des solutés accumulés (Acevedo *et al.*, 1979 ; Ackerson, 1981).

Les solutés responsables de l'osmorégulation sont essentiellement des acides organiques, des acides aminés et des sucres. Certains constituants inorganiques peuvent être présents. Parmi les acides aminés, l'accumulation de la proline pourrait conduire à une osmorégulation plus efficace. L'ajustement osmotique peut être aisément évalué à partir des mesures de potentiel osmotique et de la teneur relative en eau, l'accumulation des sucres solubles étant la cause essentielle de la baisse du potentiel osmotique (Rekika, 1997).

II-3-3 Les adaptations biochimiques

II-3-3-1 Accumulation de la proline

Parmi les changements biochimiques constatés chez les plantes placées sous déficit hydrique, on trouve l'accumulation de la proline. En effet, cette accumulation est l'une des stratégies adaptatives fréquemment observées chez les plantes pour limiter les effets du stress hydrique. Elle est liée à l'osmorégulation cytoplasmique (Acevedo *et al.*, 1989).

Benabderrahim *et al.*, (2008), ont montré que pour tous les génotypes qui ont été étudiés l'accumulation de proline a augmenté chez les plantes de luzerne exposées à un stress hydrique. Ces données ont confirmé que la proline est un acide aminé important pour l'ajustement osmotique chez la luzerne soumis à un déficit hydrique. Les molécules organiques accumulées tels que la proline et la glycine bêtaïne sont appelés solutés compatibles (Oukarroum *et al.* 2012), car ils peuvent être accumulés à des concentrations élevées sans perturber les fonctions physiologiques normales (Safarnejad *et al.* 1996).

II-3-3-2 Accumulation des sucres solubles

Lors d'un déficit hydrique, les réserves amylacées sont progressivement utilisées et pourraient être un facteur de tolérance d'un manque d'eau. Lorsque la contrainte hydrique cesse, la feuille reconstitue les réserves d'amidon, et si une nouvelle contrainte hydrique intervient, le temps d'adaptation est plus court (Hirech, 2006).

Une accumulation importante des sucres solubles a été rapportée chez plusieurs espèces en présence du stress hydrique telles que le soja (De Ronde *et al.*, 2004 ; Muller *et al.*, 1996) et le blé (Bajji *et al.*, 2001).

II-3-3-3 Synthèse des protéines

Les conditions de sécheresse apportent des changements quantitatifs et qualitatifs sur les protéines végétales (Seyed *et al.*, 2012).

La déhydrine est une protéine hydrophile induite par le stress hydrique et par l'ABA. Elle peut être synthétisée dans les différents organes de la plante (Galau et close, 1992).

L'induction des protéines par le déficit hydrique dépend du stade de développement de l'organe considéré et du génotype (Riccardi *et al.*, 1998 ; Vincent *et al.*, 2005).

CHAPITRE 2:

MATERIELS ET METHODES

I- Protocole expérimental de l'essai au champ

I-1 Site d'installation de l'essai

L'essai est installé au champ dans le Domaine Expérimental Sâada de l'INRA de Marrakech situé à 14 Km au Sud-Ouest de la ville de Marrakech sur la route d'Essaouira. Ce Domaine expérimental est soumis à un climat semi-aride avec un hiver froid et un été chaud et sec. En plus des eaux pluviales, le Domaine dispose comme ressources hydriques d'eau de barrage (débit de 30 l/s) et de deux forages de 150 m de profondeur. Actuellement l'irrigation est assurée par l'eau de forage. Le sol du Domaine étant limono-argileux et pauvre en matière organique.

I-2 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de 154 familles demi-frères issus d'un croisement entre trois cultivars de luzerne (*Medicago sativa* L.) ayant présentées une grande tolérance au déficit hydrique estival et une bonne adaptation aux conditions marocaines.

Tableau1. Origine des cultivars utilisés en croisement (Bouizgaren *et al.*, 2011)

Cultivars	Origine	Classe de dormance hivernale
Mamuntanas	Italie	7
Erfoud	Maroc	9
Sardi 10	Australie	10

I-3 Germination de semences

Avant la transplantation des plantes au champ, les semences de 154 familles demi-frères ont été germées dans des plateaux en plastiques dont les alvéoles ont été remplis par la tourbe. La germination a été réalisée sous serre.

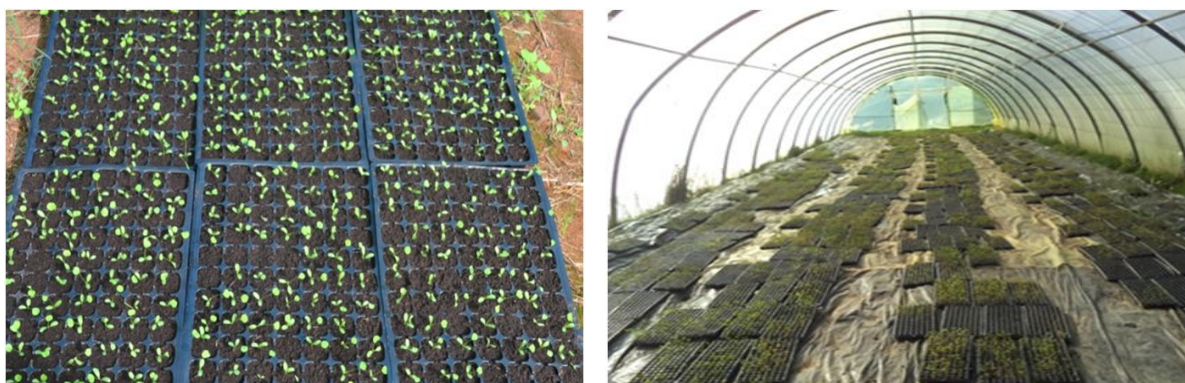


Photo 1. Germination des semences des 154 familles demi-frères sous serre

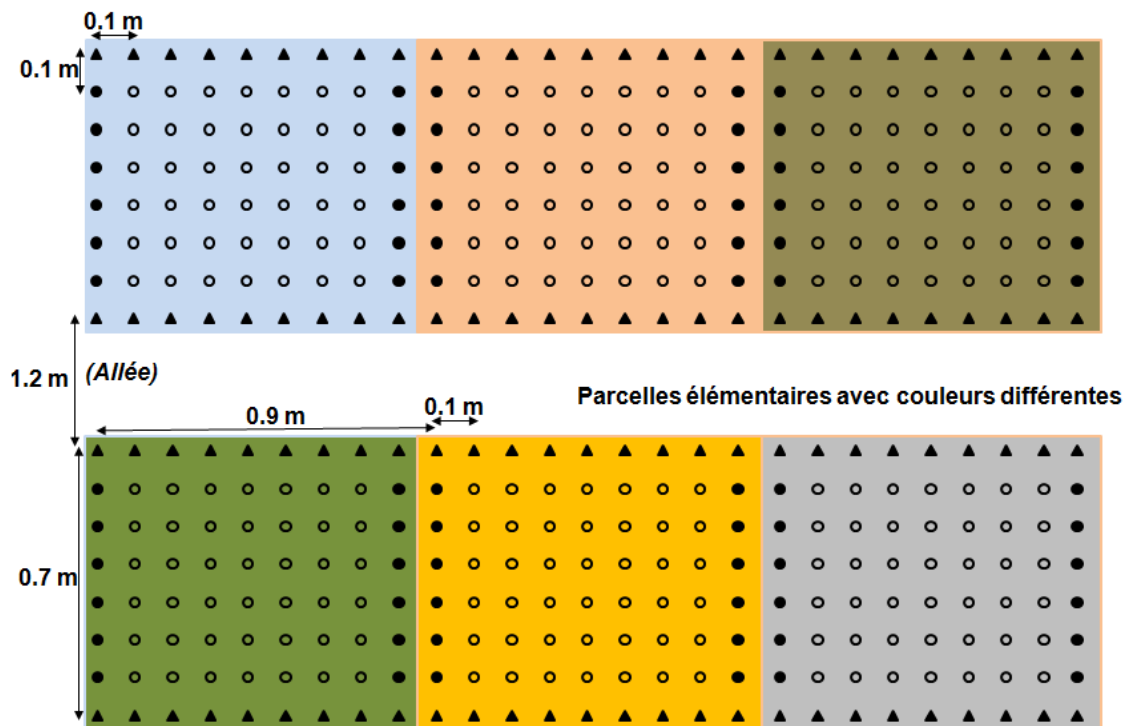
I-4 Installation de l'essai

Le modèle expérimental adopté pour l'essai est (Alpha Lattice Designs) avec cinq répartitions. Chaque répartition comporte 14 blocs aléatoires incomplets. Chaque bloc comporte 11 parcelles élémentaires correspondant à une famille demi-frère représentée par 42 plantes. Les bordures de chaque parcelle élémentaire ont été plantées par une variété contrôle (Siriver). Les plantes des deux lignes de bordures droites et gauches (12 plantes chacune) ont été évaluées afin de corriger l'effet du gradient de fertilité s'il y a lieu.

REP	1	(CELLS CONTAIN PLOT NUMBERS ON TOP, TREAT									
PLT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BLK	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	8	51	36	75	70	24	28	43	90	119	79
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2	129	44	55	62	107	101	5	66	94	21	131
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
3	31	153	10	151	64	85	38	37	93	132	117
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
4	146	61	46	74	25	20	95	78	83	144	42
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
5	63	14	13	39	15	27	67	45	58	80	50
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
6	32	60	69	40	96	22	122	7	23	92	124
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
7	6	118	52	3	136	41	111	71	104	84	73
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
8	9	47	34	59	115	18	140	29	87	103	1
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
9	114	145	121	86	30	148	100	16	35	133	2
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
10	138	120	154	65	72	108	137	97	106	11	81
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
11	150	123	57	109	89	127	113	142	147	82	102
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
12	19	98	126	88	77	4	143	68	152	105	110
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143
13	128	99	56	139	112	125	54	130	141	12	17
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
14	53	76	48	49	26	116	134	33	91	135	149
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Bloc aléatoire
incomplet

Figure 3. Plan de la première répétition de l'essai installé selon le modèle expérimental Alpha-Lattice.



- Plantes mesurées de la famille testée. Au total: 42 plantes par parcelle élémentaire
- Plantes bordures mesurées de la variété contrôle. Au total: 12 plantes par parcelle élémentaire
- ▲ Plantes non mesurées de la variété contrôle. Au total: 18 plantes par parcelle élémentaire

Figure 4. Plan des parcelles élémentaires

I-5 Application du stress

Le déficit hydrique a été appliqué sur l'ensemble de l'expérience d'abord par un stress modéré en apportant des irrigations qui correspondent à 20 mm d'eau au cours des mois Avril et Mai, et un stress sévère au début de juillet jusqu'à mi-septembre dont l'irrigation a été arrêtée tout au long de cette période. Le reste de l'année, aucun stress n'a été appliqué.

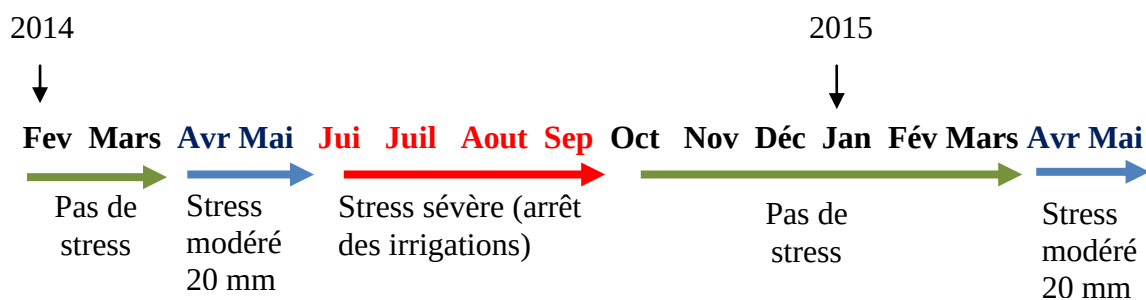


Figure 5. Application du stress hydrique au niveau de l'essai

II- Les paramètres évalués

II-1 Paramètres agronomiques

a. Hauteur de la tige (HT)

La hauteur des plantes a été mesurée à l'aide d'une règle graduée. Ce paramètre nous permet d'évaluer l'effet du déficit hydrique sur la croissance aérienne des plantes. On est réalisé trois répétitions par parcelle élémentaire.

b. Surface foliaire (SF)

La surface foliaire est déterminée à l'aide du logiciel « Image J ». Les étapes à suivre pour effectuer cette mesure :

- Coller 28 feuilles de chaque génotype sur une feuille blanche avec échelle.
- Scanner l'ensemble à l'aide d'un scanner numérique.
- Traiter l'image numérisée avec « Image J » qui permet d'obtenir la surface des feuilles.
- 4 feuilles de taille moyenne par parcelle élémentaire ont été choisies au hasard.

c. Matière verte (MV)

Après séparation de la partie aérienne de la partie racinaire des plantes, le poids de la matière verte a été déterminé par pesée des plantes de chaque parcelle élémentaire.

d. Taux de mortalité

Les plantes mortes dans chaque parcelle élémentaire ont été comptées. Le taux de mortalité des plantes est exprimé en pourcentage.

II-2 Les paramètres physiologiques

a. Déficit de saturation hydrique

Les tissus des plantes sont les plus souvent en état de déficit hydrique et le DSH permet d'apprécier cet état (Coudret, 1981). Pour déterminer le DSH, des échantillons de feuilles ont été prélevés et leur poids frais (MF) a été mesuré. Le poids de saturation en eau d'échantillons (MFsat) a été déterminé en les gardant dans l'eau pendant 4 h. Puis, leur poids sec (MS) a été déterminé après séchage d'échantillons au four à 80°C pendant 24h. Le DSH a été défini comme suit:

$$\text{DSH \%} = ((\text{MFsat} - \text{MF}) / (\text{MFsat} - \text{MS})) * 100$$

b. Potentiel hydrique

Le potentiel hydrique des plantes a été mesuré à l'aide d'une chambre à pression (PMS Instrument Company model 1000). Il s'agit d'estimer, à l'aide de la pression d'un gaz neutre appliqué sur une feuille, la capacité des cellules à retenir l'eau. Moins il y aura d'eau libre dans la plante, plus la pression nécessaire pour la faire sortir sera forte. Par conséquent, la pression nécessaire pour extraire la sève de la feuille, est exprimée en Bar, toujours en valeur négative. Ce potentiel représente l'état hydrique de la plante à un instant donné.

Le potentiel hydrique de trois feuilles de chaque famille demi-frère a été mesuré.

c. Conductance stomatique

La mesure de la conductance des stomates a été faite sur des feuilles saines à l'aide d'un poromètre (Leaf porometer, model SC1, DECAGON DEVIS, version, 2012). On est réalisé trois mesures dans chaque parcelle élémentaire. La conductance stomatique est exprimée en mmol de H₂O/m².s. Sous une température de 36°C±1 et une humidité relative d'environ 60% ± 2.

d. Fluorescence chlorophyllienne

Pour évaluer l'intégrité fonctionnelle du photosystème II (PS II), des mesures de la fluorescence chlorophyllienne ont été faites sur des feuilles matures et saines, à l'aide d'un fluorimètre portatif (OPTI-SCIENCES OS30p+). Trois mesures par parcelle élémentaire a été faite.

Les mesures ont portées sur les paramètres suivants :

- Fluorescence initiale (**F₀**): c'est la valeur minimale de la fluorescence lorsque tous les accepteurs d'électrons du photosystème II (PS II) sont complètement oxydés.

- Fluorescence maximale (**F_m**): elle correspond à la valeur maximale de la fluorescence obtenue pour la même intensité lumineuse. Cette valeur est obtenue lorsque toutes les premières quinones accepteuses d'électrons sont complètement réduites;

Rendement quantique: il est exprimé par le rapport $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$, dans lequel F_v est la fluorescence variable.

II-3 Paramètres biochimiques

a. Teneur en chlorophylle

La teneur en chlorophylle a été déterminée selon la méthode d'Arnon (1949), cette méthode consiste à broyer 60 à 80 mg de feuilles dans l'acétone 80 % pour l'extraction de la chlorophylle, puis l'extrait a été centrifugé à 5000×g pendant 15 min. Après on mesure la densité optique au spectrophotomètre à 663 et 645 nm. La teneur en chlorophylle a été déterminée selon la formule suivante:

$$\text{Chlorophylle Totale (mg.ml}^{-1}\text{)} = (20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663})$$

Avec, A= absorbance

b. Dosage des protéines solubles

➤ Extraction

L'extraction des protéines solubles a été réalisée par broyage de 100 mg MF à froid dans 4 ml du tampon Tris- HCl 0,1 M à pH 7,5 (Annexe 1). Le broyat a été ensuite centrifugé à 16000 × g pendant 15min. Le surnageant a été récupéré et a servi pour le dosage des protéines solubles.

➤ Dosage

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Bradford (1976). 1 ml d'extrait dilué a été prélevé dans des tubes et additionnés de 2 ml du réactif de Bradford (Annexe 2). Après agitation suivie d'un repos de 4 min à température ambiante, la densité optique (DO) a été mesurée à 595 nm. Les quantités de protéines ont été déterminées en utilisant une gamme étalon établie par des solutions de sérum albuminé du bovin (SAB) (Annexe 3).

c. Dosage de la proline et des sucres solubles

➤ Extraction

L'éthanol peut être substitué à MCE (Méthanol Chloroforme-eau) pour l'extraction suivant la méthode de l'AOAC (Association of Official Analytical chemists, 1955) modifiée par Nguyen et Paquin (1971). Il a l'avantage de permettre sur le même extrait le dosage des sucres, des acides organique et d'autres composés solubles.

Environ 200mg de matière sèche de différents génotypes sont broyés dans 5ml d'éthanol 95% suivi de trois rinçages et lavage avec 5ml d'éthanol 70% chaque fois. Pour

l'extraction de la proline on prélève 5ml de surnageant auxquels on ajout 2ml de chloroforme et 3ml d'eau. On laisse reposer toute la nuit.

➤ Dosage de la proline

Selon la méthode de Singh et al.,(1973) modifiée. On prélève de 0,2 à 1 ml de la phase supérieur de l'extrait en évitant de toucher à la phase inférieure. On ajout alors 10 ml d'eau et après agitation on ajout 5ml du réactif la ninhydrine (0.125g de ninhydrine dans 2ml de H₃PO₄ 6M plus 3ml de l'acide acétique glacial) (Annexe 4) et de 5ml de l'acide acétique glacial. Après agitation et chauffage à bain marie à 100°C pendant 45 min. Le mélange est refroidi et 2ml de toluène a été ajouté. Après agitation, on laisse reposer de 25 à 30 minutes. La densité optique de la phase supérieure est réalisée par spectrophotomètre à 520 nm. La teneur en proline est effectuée à l'aide d'une gamme étalon (Annexe 5).

➤ Dosage des sucres solubles

On prélève 1ml de l'extrait alcoolique auquel on ajout 3 ml d'anthrone (150 mg d'anthrone, 100 ml d'acide sulfurique à 72%) (Annexe 6). Les échantillons placés dans un bain d'eau bouillante pendant 10 minutes. Après on mesure la densité optique au spectrophotomètre à 625nm. La teneur en sucres solubles est déterminée à l'aide d'une gamme étalon de glucose (Annexe 7) et exprimées en mg g⁻¹ de matière sèche de feuilles.

III. analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SPSS version 20.0.

1- Analyse de la variance (ANOVA) à un critère de classification, selon le Modèle Mixte

$$\text{Linaire : } Y = \mu + P_j + b_{m(j)} + \tau_i + e_{ij}$$

P_j: Répétition (j= 1...r ; r=2)

b_{m(j)} : Bloc incomplet (m = 1...s ; s=14)

τ_i : Famille (génotype) (i = 154)

e_{ij} ; Erreur résiduelle

2- Lorsque une différence est révélée significative pour un paramètre donnée, les familles demi-frères ont été classées par le Test Newman & keuls en groupes homogènes.

3- Corrélations pour déterminer les relations entre le rendement fourrager et la persistance et les paramètres étudiés.

CHAPITRE 3:

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Caractérisation de la variabilité des paramètres agronomiques

I-1 Analyse de la variance

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré l'existence des différences significatives entre les familles demi-frères de luzerne testées (tableau 2) vis-à-vis les paramètres agronomiques étudiés.

Tableau 2 : Analyse de la variance (ANOVA) pour les paramètres agronomiques étudiés

Paramètres agronomiques	Somme des carrés de type III	d.d.l	Moyenne des carrés	Fisher	Signification ($\alpha=5\%$)
Matière Verte	79,31	153	0,518	1,63***	<0.0001
Hauteur des plantes	11815,87	153	77,22	3,607***	<0.0001
% de plantes mortes après application du stress estival	196,34	153	1,28	1,97***	<0.0001
surface foliaire	936,35	153	6,12	26,88***	<0.0001

*** : très hautement significatif

I-2 Rendement en matière verte (MV)

Les rendements en matières vertes enregistrés pour les familles étudiées de luzerne ont variés entre 0,37 kg/m² pour la famille demi-frères '141' et 3,86 kg/m² pour la famille '17'. La figure 6 montre le classement des familles demi-frères selon leurs rendements en matière verte.

La classe des familles demi-frères ayant un bon potentiel fourrager (>1,8 kg/m²) ne représentent que 3,24% de l'ensemble du matériel végétal étudié. Quant aux familles demi-frères présentant un faible rendement fourrager, leurs fréquences est d'environ 6%. La majorité des familles (environ 50%) ont des valeurs de ce paramètre qui varient entre 0,8 kg/m² et 1,35 kg/m².

Toutefois, le test de Student-Newman-Keuls n'a décelé que deux groupes de familles homogènes. Le premier est constitué par la famille '17' et le second est formé par le reste des familles demi-frères.

Ce rendement en biomasse est l'un des principaux caractères visés pour la création de nouvelles variétés. Ces familles demi-frères sont issues des croisements par pollinisation libre entre trois cultivars ayant des origines géographiques différents. Ces cultivars ont des différents potentiels d'adaptation aux conditions locales de la région du Haouz. Ceci explique les variations des rendements notées au sein du matériel végétal étudié. En outre, ils possèdent différentes classes de dormance hivernale. Ce phénomène de repos hivernal a été décrit très tôt chez la luzerne (Steinmetz, 1926). Il est imposé à la plante par des conditions environnementales défavorables. Les températures basses, la photopériode courte ainsi que l'interaction entre la température et le photopériodisme jouent un rôle prépondérant au niveau de ce phénomène (Birouk, 1989). Ce caractère est également recherché et explique en partie la variation du rendement noté au sein des familles étudiées.

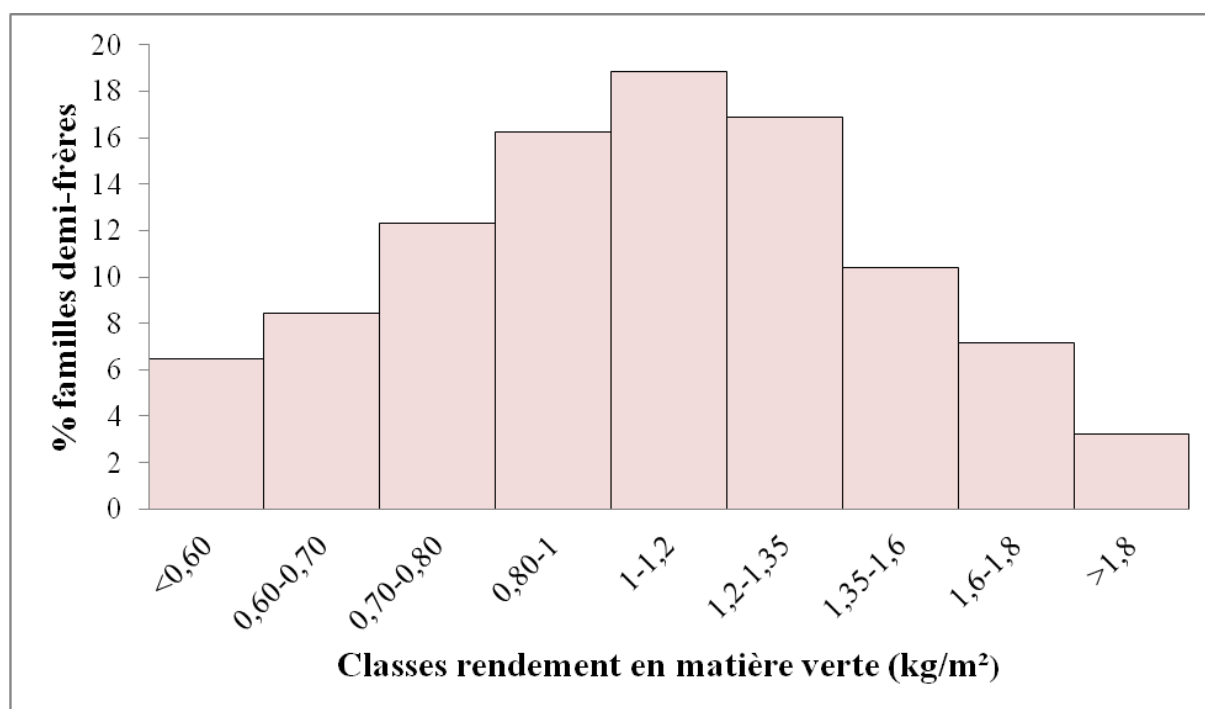


Figure 6. Distribution des familles de luzerne selon leur rendement en matière verte.

I-3 Taux de mortalité des plantes sous stress hydrique estival

Les familles demi-frères étudiées ont montrées une large variation pour la tolérance au stress hydrique estival imposé par des arrêts des irrigations entre juin et mi-septembre. Cette tolérance est exprimée en termes de pourcentage de mortalité des plantes calculé après réhydratation en fin été. Ce paramètre a varié entre 1,38%

et 4,83%. Environ 10% des familles demi-frères ont une bonne persistance au stress estival. Alors qu'environ 37% des familles demi-frères ont enregistrés des taux de mortalités des plantes qui dépassent 3,5% (figure 7).

Le test de Student-Newman-Keuls a permis de regrouper les familles demi-frères étudiées en quatre groupes selon leurs taux de mortalités.

Cette large variabilité de la persistance notée au sein des familles étudiées est vivement recherchée pour la sélection d'un matériel ayant un grand potentiel du repos estival. Une famille est considérée persistante si elle possède un équilibre stable ou une augmentation nette entre la production et la perte de plantes sur une longue période (Nie et Norton, 2009). L'idiotype recherché dans notre cas est une famille qui a une endurance à la sécheresse estivale couplée avec un taux de croissance élevé lorsque la disponibilité d'humidité est non limitante (Pecetti *et al.*, 2010). Ce repos estival est une meilleure stratégie d'économie de l'eau au cours de cette période où l'efficacité d'utilisation de l'eau est très faible chez la luzerne (Bouizgaren *et al.* 2011).

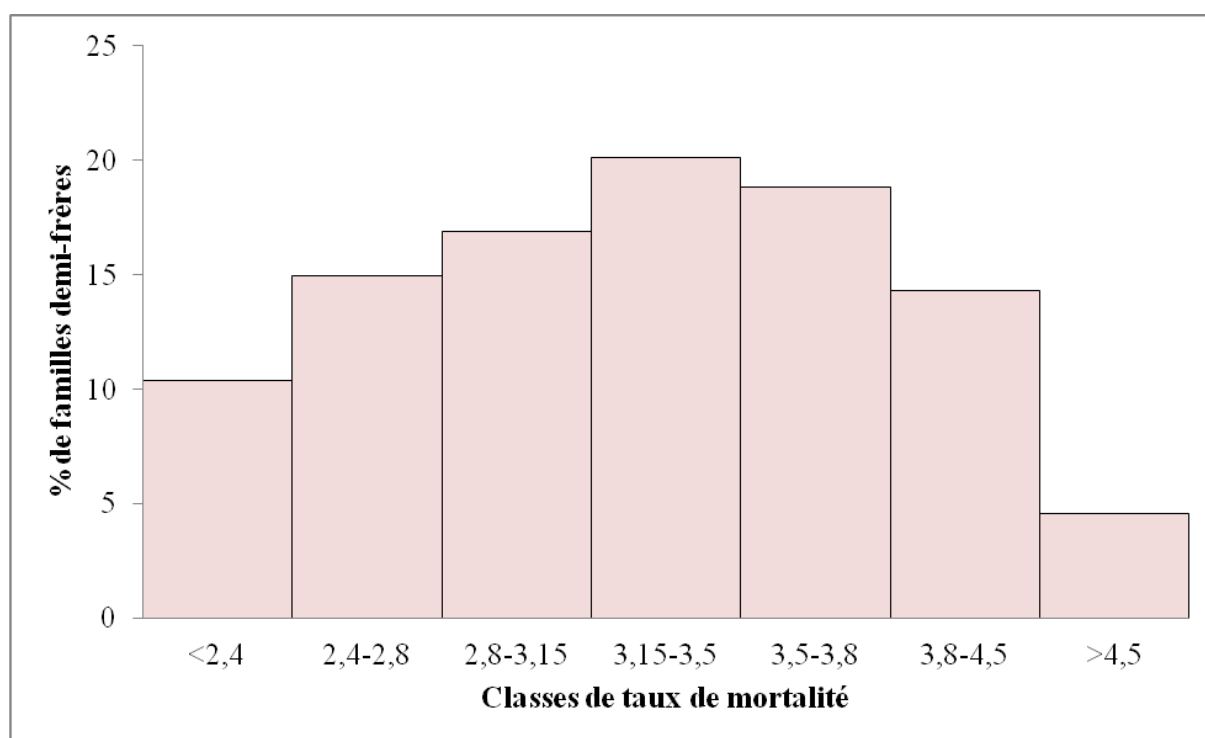


Figure 7. Distribution des familles de luzerne selon leur taux de mortalité après application du stress hydrique estival.

I-4 Hauteur de la tige principale (HT)

Une large variation de la hauteur de la tige principale a été notée au sein des familles étudiées. Ce paramètre a varié entre 44 cm et 72,3 cm chez les familles '106' et '30' respectivement. Environ, 52% des familles ont présentées une hauteur qui varie entre 62 et 66 cm. Alors qu'uniquement 11% des familles ont dépassées une hauteur de 68 cm (figure 8).

Le test de Student-Newman-Keuls nous a permis de classer les familles étudiées en 12 classes qui se chevauchent entre eux.

Christan (1977), Matthias and Smith (1997) et Baï and Li (2003) ont signalé que la luzerne, malgré sa capacité d'exploiter le sol profond grâce à ses racines pivotantes, sa croissance est fortement réduite en cas de déficit d'alimentation hydrique. D'autres travaux ont montrés que le déficit hydrique provoque une réduction de la croissance des plantes (Farooq et al., 2008). Il inhibe l'élongation cellulaire, réduit la photosynthèse, interfère avec l'absorption minérale, et altère le niveau des hormones (Antolin and Sanchez-Diaz 1993; Kusaka et al., 2005; Shao et al., 2008). Ceci est lié en partie aux réserves racinaires des plantes. De nombreuses études ont signalées que le déficit hydrique a réduit significativement la biomasse racinaire (Laouar *et al.*, 2001).

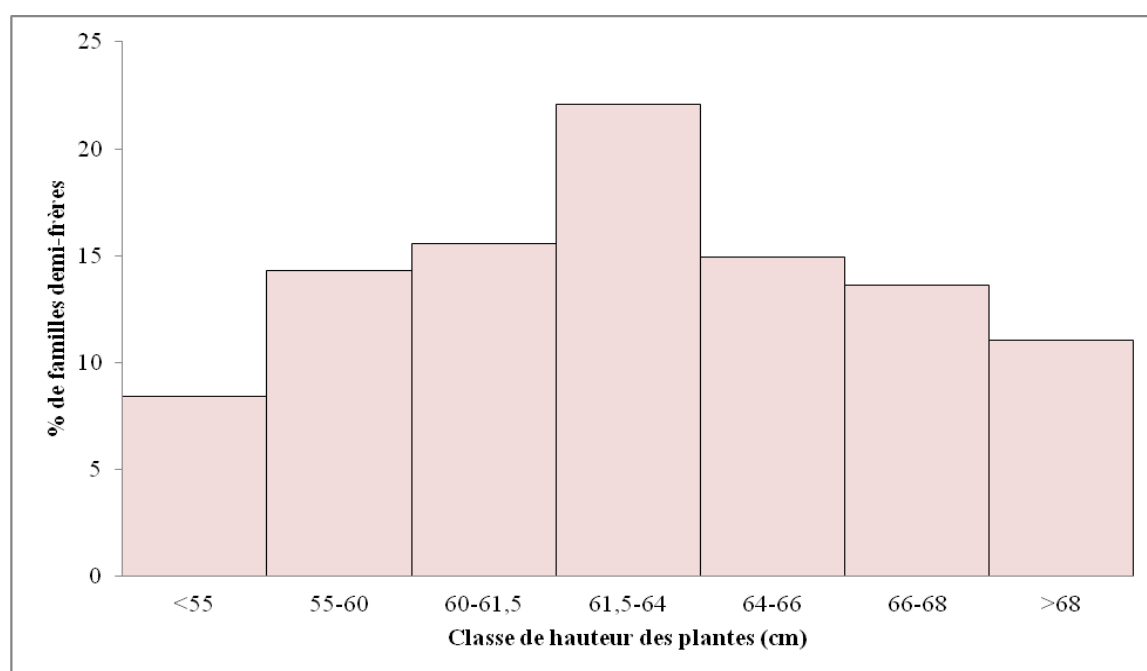


Figure 8. Distribution des familles de luzerne selon la hauteur de leur tige principale

I-5 Surface foliaire (SF)

La surface foliaire a variée significativement entre les familles demi-frères étudiées. Les valeurs de ce paramètre ont oscillées entre 2.4 cm² et 12.92 cm² chez les familles demi-frères '152' et '99' respectivement. La majorité des familles demi-frères (environ 60%) possèdent des feuilles qui ont des surfaces foliaires qui varient entre 4,4 et 6,5 cm². Toutefois moins de 4% des familles demi-frères ont des feuilles larges qui dépassent 7,5 cm² (figure 9).

Le test de Student-Newman-Keuls a décelé une variabilité concernant la surface foliaire chez les différentes familles demi-frères étudiées. En effet, il nous a classé les génotypes en sept groupes de surface foliaire.

L'effet du déficit hydrique sur la surface foliaire a été rapporté par Saeed et El-Nadi (1997), Aranjuelo *et al.*, (2001) et Freyer *et al.*, (2005) qui ont trouvé des différences significatives de la surface foliaire entre des plantes stressées et non stressées. Le stress hydrique a affecté le processus d'initiation des feuilles, le nombre de feuilles produites, et la taille du limbe principalement par un effet sur la division cellulaire, et la taille des feuilles (Brown et Tanner, 1983). La réduction de la surface du limbe enregistrée sous le régime plus restrictif est très souvent associée à un évitement de la contrainte hydrique (Fussel *et al.* 1991). Darera *et al.* (1969) cité par Hireche (2006) ont présumé que la diminution de la surface de limbe est un trait majeur des plantes visant à limiter leurs besoins en eau lorsque celle-ci est très insuffisante.



Figure 9. Distribution des familles demi-frères étudiées selon leur surface foliaire.

I-6 Corrélation entre les paramètres agronomiques

L'étude de corrélation entre les paramètres agronomiques étudiés a révélé l'existence d'une corrélation négative significative entre le rendement en matière verte et le taux de mortalité de plantes sous l'effet du stress hydrique estival (tableau 3).

La persistance élevée pourrait expliquer, au moins partiellement, la production de la matière verte relativement élevée, noté chez les familles demi-frères ayant un bon rendement fourrager. Ce dernier a présenté aussi une corrélation significative mais positive avec la hauteur de la tige principale. Chez les plantes sensibles, le stress hydrique inhibe à la fois l'hypertrophie des cellules et la division cellulaire (Jaleel *et al.*, 2009). Il réduit la croissance des plantes en affectant divers processus physiologiques et biochimiques, tels que la photosynthèse, la respiration, la translocation, l'absorption d'ions, les glucides, le métabolisme des nutriments et des promoteurs de croissance (Jaleel *et al.*, 2008 ; . Farooq *et al.*, 2008). C'est ainsi que nous avons noté la corrélation négative ($R^2=-0.185$) entre la hauteur des tiges principales et le taux de mortalité des plantes. Toutefois, la surface foliaire n'a présentée aucune corrélation avec les autres paramètres agronomiques étudiés (tableau 3).

Tableau 3. Corrélation entre les paramètres agronomiques étudiés

	Matière Verte	% de mortalité des plantes après application du stress hydrique	Hauteur des tiges principales	Surface foliaire
Matière Verte	1	-0.738**	0.095*	0.020NS
% de mortalité des plantes après application du stress hydrique		1	-0.185**	0.010NS
Hauteur des tiges principales			1	-0.010NS
Surface foliaire				1

NS : non significatif

II. Caractérisation de la variabilité des paramètres physiologiques

II-1 Analyse de la variance

L'analyse de la variance (ANOVA) a montrée l'existence des différences hautement significatives entre les familles demi-frères de luzerne testées pour les quatre paramètres physiologiques étudiés (tableau 4).

Tableau 4. Analyse de la variance (ANOVA) pour les paramètres physiologiques étudiés

Paramètres physiologiques	Somme des carrés	d.d.l	Moyenne des carrés	Fisher	Signification
Déficit de saturation hydrique (%)	134949,3	153	882,020	1460,68**	<0.001
potentiel hydrique	26764,7	153	174,900	8,84***	<0.0001
Fluorescence chlorophyllienne	22,4	153	0,146	1174,05***	<0.0001
Conductance stomatique	1854810,2	153	12122,90	2535,98***	<0.0001

*** : très hautement significatif. ** : hautement significatif

II-2 Déficit de saturation hydrique (DSH)

Ce paramètre a enregistré une large variation entre les familles demi-frères étudiées. Il a été varié entre 0.91% et 72.9%. Environ 49% des familles demi-frères étudiées ont enregistrées des taux de DSH compris entre 15% et 40%. Toutefois, 10% de ces familles ont présentées des déficits de saturation de moins de 5% (figure 10).

Le test de Student-Newman-Keuls a décelé une variabilité au sein de ce matériel végétal étudié. Ce dernier a été réparti en 40 groupes.

Le maintien d'un niveau adéquat de la TRE serait probablement lié à une bonne capacité d'ajustement osmotique permettant la préservation de l'intégrité structurale et fonctionnelle des tissus (Blum, 1988; Verslues *et al.*, 2006). Grimes *et al.* (1992) ont rapporté que le déficit hydrique affecte négativement le rendement de la biomasse et le contenu relatif en eau des plantes, et ont avancé l'existence d'une relation linéaire positive entre le rendement et la capacité de la transpiration. Ce qui explique la réduction de la biomasse sous la restriction des irrigations en été et en automne où la consommation d'eau sous forme de

transpiration et évaporation du sol sont élevées. Ce résultat est en concordance avec celui trouvé par Zhao *et al.* (2004).

La TRE dans la feuille est un bon indicateur de l'état hydrique (Hassani *et al.*, 2008) et constitue un facteur déterminant pour l'activité métabolique et la survie des feuilles (Sinclair et Ludlow, 1985). Sa réduction indique une perte de la turgescence entraînant une faible disponibilité de l'eau pour l'extension cellulaire (Katerji *et al.*, 1997).

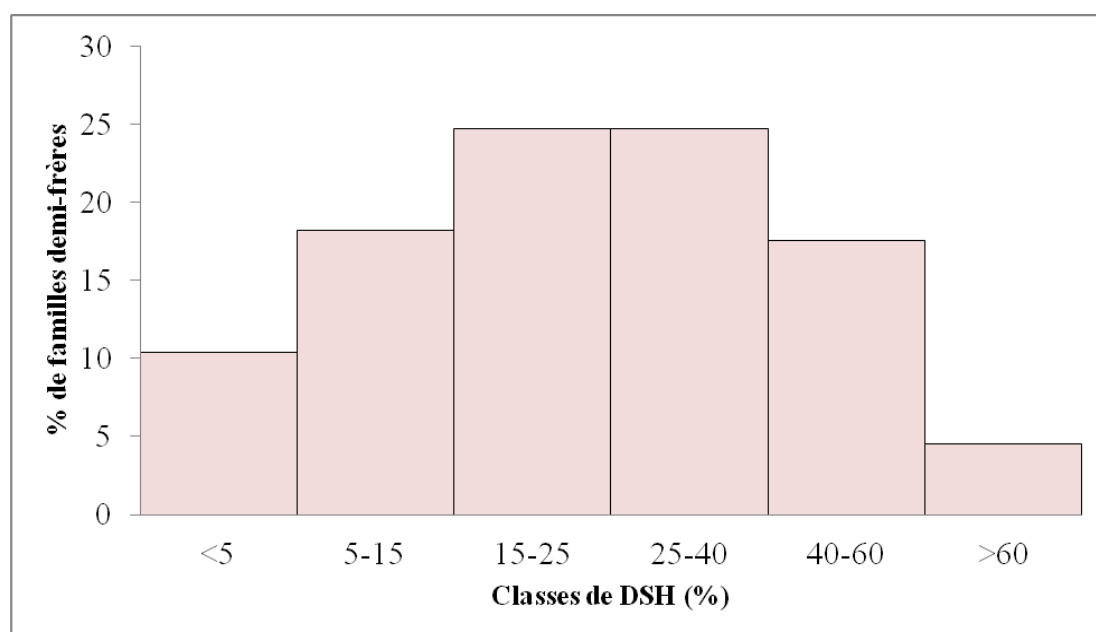


Figure 10. Distribution des familles demi-frères étudiées selon leur déficit de saturation hydrique

II-3 Potentiel hydrique

Ce paramètre a varié significativement entre les familles demi-frères étudiées. Les valeurs obtenues ont varié entre -29.3 bar à -1.5 bar. Environ 38% des familles demi-frères ont des potentiels hydriques compris entre -14 et -3.5 bar (figure 11).

A l'aide du test Student-Newman-Keuls, les familles demi-frères étudiées ont été classées en 23 groupes qui se chevauchent entre eux.

Les travaux de Levit (1972) sur le blé ont montrés que les plantes tolérantes au stress hydrique présentent une faible perte d'eau par unité de surface foliaire et une augmentation de leur potentiel hydrique foliaire comparativement aux plantes sensibles.

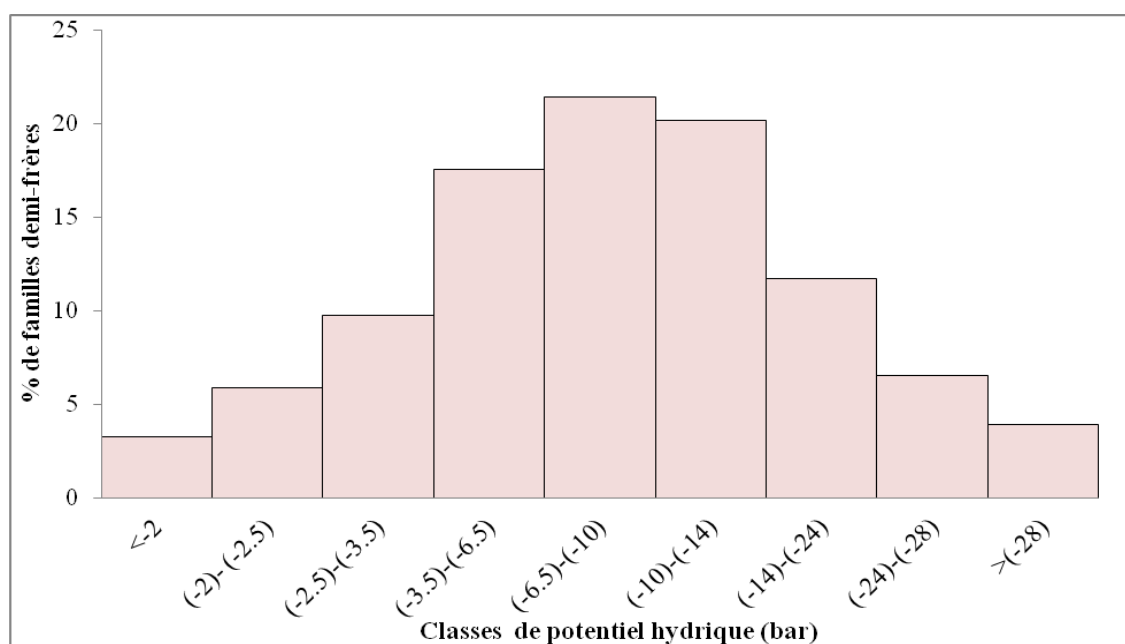


Figure 11. Distribution des familles demi-frères selon leur potentiel hydrique.

II-4 Conductance stomatique

La conductance stomatique a variée entre 11,43 et 320,7 mmol H₂O/m²s. Cette variation a été notée hautement significative. Nous avons observé que 26.6% des familles demi-frères ont des valeurs qui dépassent 100 mmol H₂O/m²s vis-à-vis de ce paramètre (figure 12).

La classification de ce matériel végétal à l'aide du test Student-Newman-Keuls a fait sortir 55 groupes qui se chevauchent entre eux.

Selon Saeed et El-Nadi (1997), la sensibilité des plantes au stress hydrique des sols augmente dans des conditions de températures élevées, d'une faible humidité relative, et des intensités de lumière élevées. Toutes ces conditions augmentent considérablement la transpiration.

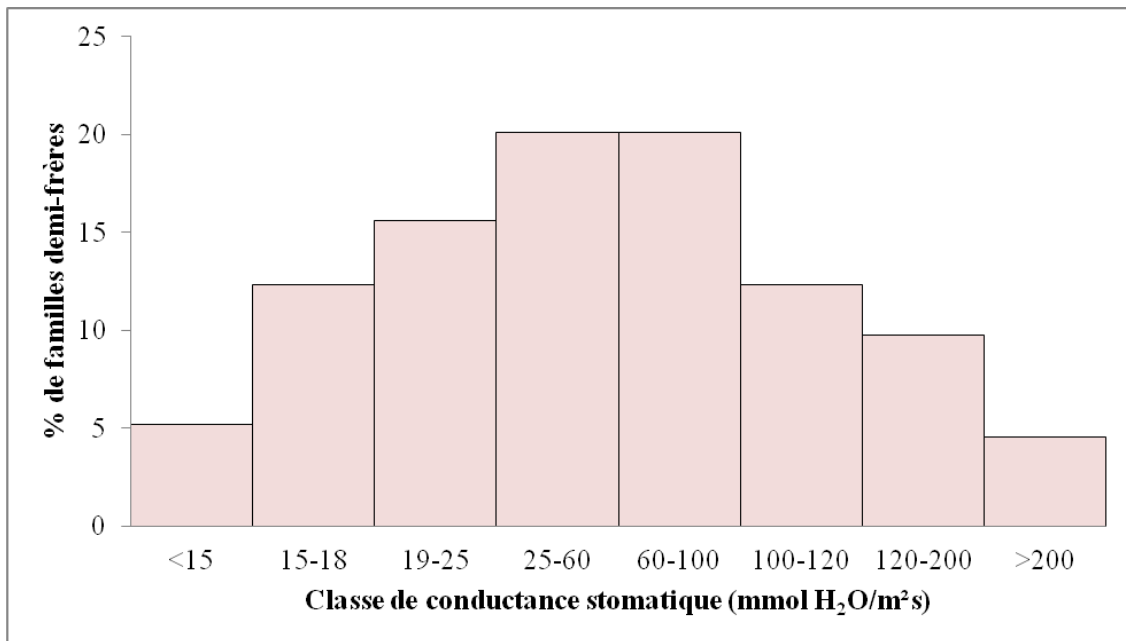


Figure 12. Distribution des familles demi-frères étudiées selon leur conductance stomatique

II-5 Fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence chlorophyllienne a variée significativement entre 0.058 et 0.867. Uniquement 11,6% des familles demi-frères ont présentée des niveaux de ce paramètre qui dépasse 0.8 (figure 13). Le test Student-Newman-Keuls a permis de dégager 46 groupes de familles demi-frères. Avec l'existence des chevauchements entre ces groupes.

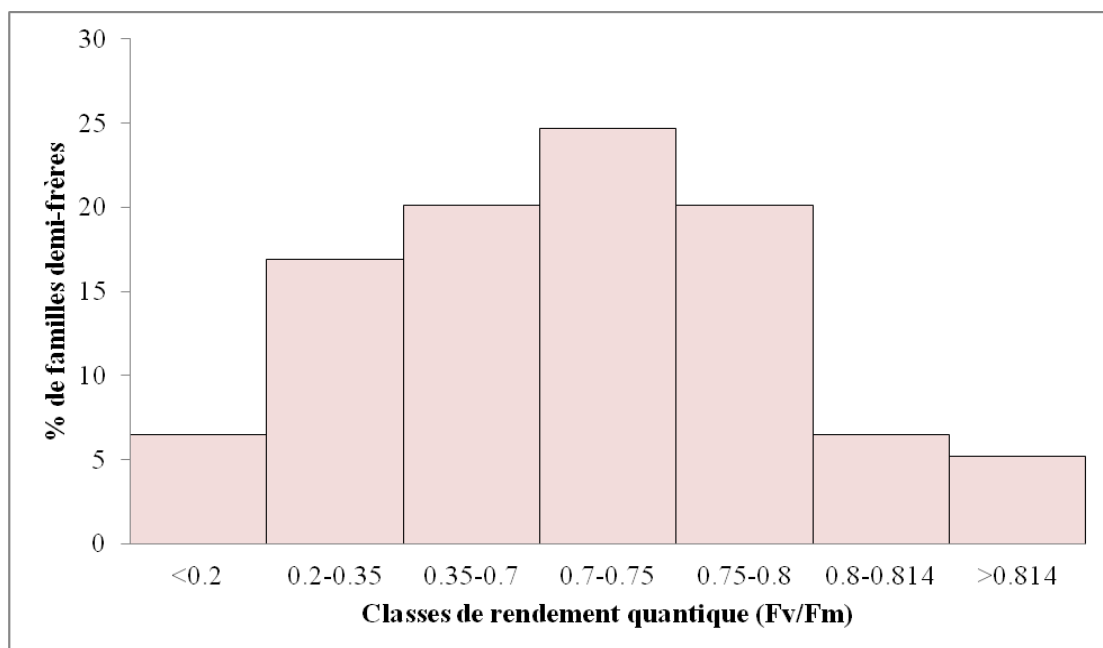


Figure 13. Distribution des familles demi-frères de luzerne selon leur rendement quantique.

II-6 Corrélation entre les paramètres physiologiques

Deux corrélations significatives ont été notées entre les paramètres physiologiques étudiées (tableau 5). La première est positive entre le déficit de saturation hydrique et le potentiel hydrique. La deuxième est positive entre la fluorescence chlorophyllienne et la conductance stomatique. Toutefois, il a été rapporté dans la littérature que la transpiration rapide augmente la pression de l'eau au niveau des plantes, et peut induire une réponse par les stomates pour réguler le potentiel hydrique des feuilles et éviter la cavitation vasculaire (Sperry *et al.*, 1998; Oren et coll. 1999; Sangsing *et al.*, 2004, Addington *et al.*, 2006).

Tableau 5. Corrélation entre les paramètres physiologiques étudiés.

	Déficit de saturation hydrique (%)	Potentiel hydrique	Fluorescence chlorophyllienne	Conductance stomatique
Déficit de saturation hydrique (%)	1	0.126**	-0.072NS	0.058 NS
potentiel hydrique		1	-0.056NS	-0.048NS
Fluorescence chlorophyllienne			1	0.655**
Conductance stomatique				1

NS : non significatif

Cependant, le rendement en matière verte a été corrélé positivement à la fluorescence chlorophyllienne et à la conductance stomatique. Ces deux derniers paramètres ont été corrélés négativement avec le taux de mortalité des plantes après application du stress estival (tableau 6)

Tableau 6. Corrélation entre les paramètres physiologiques et le rendement en matière verte et le taux de mortalité des plantes

	Déficit de saturation hydrique (%)	Potentiel hydrique	Fluorescence chlorophyllienne	Conductance stomatique
Matière Verte	-0.055 NS	0.037NS	0.595**	0.770**
% de mortalité des plantes après application du stress hydrique	0.069NS	0.050NS	-0.915**	-0.866**

NS : non significatif

III- Caractérisation de la variabilité des paramètres biochimiques

III-1 Analyse de la variance

L'analyse de la variance (ANOVA) a montrée l'existence des différences hautement significatives entre les familles demi-frères de luzerne testées pour tous les paramètres biochimiques étudiés (tableau 7).

Tableau 7. Analyse de la variance (ANOVA) pour les paramètres biochimiques étudiés

Variable Dépendante	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	Fisher	Signification
Proline	124271,9	153	812,2	5323,7**	<0.001
Chlorophylle	39642,8	153	259,1	2027,5**	<0.001
Sucres solubles	477431,8	153	3120,4	301,5**	<0.001
Protéine	61696,9	153	403,2	1688,9**	<0.001

** : hautement significatif

III-2 Teneur en chlorophylle

Anjum *et al.*, (2003) et Farooq *et al.*, (2009) ont signalé que le stress hydrique entraîne des changements dans le rapport de la chlorophylle 'a' et 'b' et les caroténoïdes. Plusieurs études ont déjà rapportées l'effet de ce stress et la teneur en chlorophylle. En effet, Bois (1993) a signalé chez le Mil que les processus primaires de la photosynthèse sont touchés précocement dès que la teneur relative en eau descend de 90%, ou dès que le potentiel hydrique s'abaisse. Il a suggéré que le stress hydrique a engendré une disparité de stabilité de système photosynthétique. Les mêmes constations ont été faites chez le Cotton (Massacci *et al.*, 2008), chez le *Catharanthus roseus* (Jaleel *et al.*, 2008), et chez la tournesol (Kiani *et al.*, 2008).

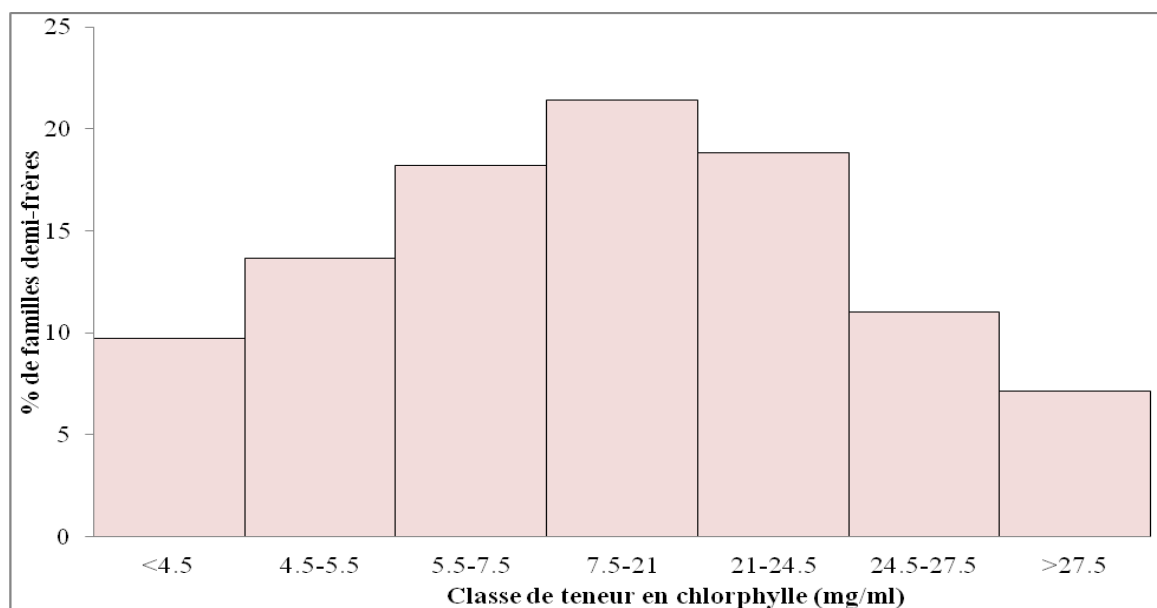


Figure 14. Distribution des familles demi-frères étudiées selon la teneur de leurs feuilles en chlorophylle.

III-3 Teneur en protéines

Les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) (tableau 7) montrent qu'il y a une variation significative de la teneur en protéines totaux entre les familles demi-frère.

Le test de Student-Newman-Keuls a permis de distinguer 43 groupes homogènes qui se chevauchent entre eux.

La teneur en protéines totales varie significativement entre 1,5 et 44,4 mg/g de MF, chez les familles demi-frères 26 et 34 respectivement. Ainsi, la figure montre qu'environ 9% des familles ont présenté une faible teneur en protéines (moins de 6 mg/g de MF), et environ 7% des familles ont montré une grande teneur en protéines (> 36 mg/g de MF) (figure 15).

D'après les résultats de Seyed et *al.*, (2012), les conditions de sécheresse apportent des changements quantitatifs et qualitatifs sur les protéines végétales. Et d'après l'étude bibliographique, La déhydrine est une protéine hydrophile induite par le stress hydrique. Elle peut être synthétisée dans les différents organes de la plante.

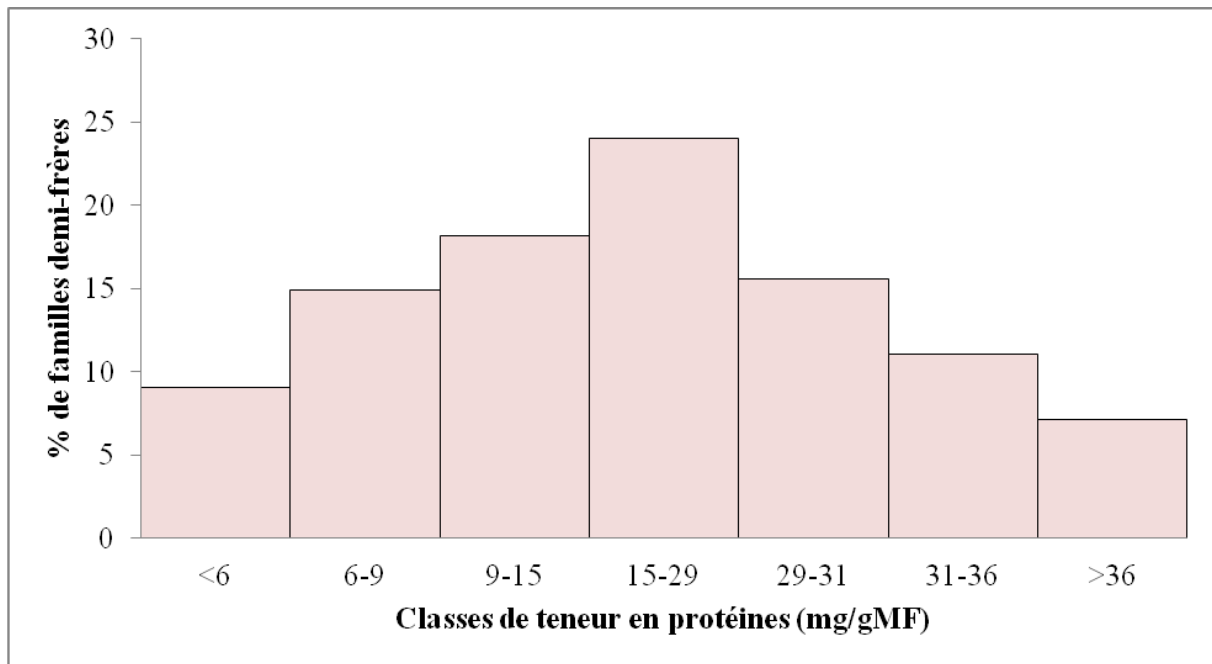


Figure 15. Distribution des familles demi-frères selon la teneur de leurs feuilles en protéine totaux.

III-4 Teneur en proline

L'ajustement osmotique apparaît aujourd'hui comme un mécanisme majeur d'adaptation à la sécheresse, il peut intervenir à tous les stades du développement (Monneveux et Thise, 1992). En effet, pour maintenir la balance de la force osmotique, après la chute du potentiel hydrique causée par le stress hydrique, les plantes accumulent un certain nombre d'osmoticums tel que la proline, les ions inorganiques, les carbohydrates et la bétaine (Casals, 1996 ; Wang et al., 2003 ; Wang et al., 2004) qui, en association avec d'autres facteurs tels que la réduction de la transpiration par la fermeture des stomates et la réduction de la surface foliaire (Karrou *et al.*, 2001), permettent de garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevé que possible (Wang *et al.*, 2003).

Ainsi, les plantes des familles demi-frères qui ont senti l'effet de stress hydrique ont effectué une réaction physiologique qui est l'accumulation de la proline dans les feuilles. En effet, Pendant le début de stress, la teneur en proline augmentent lentement, mais augmente de façon spectaculaire après la gravité du stress (Girousse et al., 1996;. Yang & Kao, 1999). Yoshiba et al. (1997) a signalé que l'accumulation de la proline est plus élevée chez la plante tolérante que chez la plante sensible. Cela implique que la proline est en mesure de soutenir la

récupération des plantes après un stress hydrique et au cours de la reprise des irrigations (Peng et al., 1996).

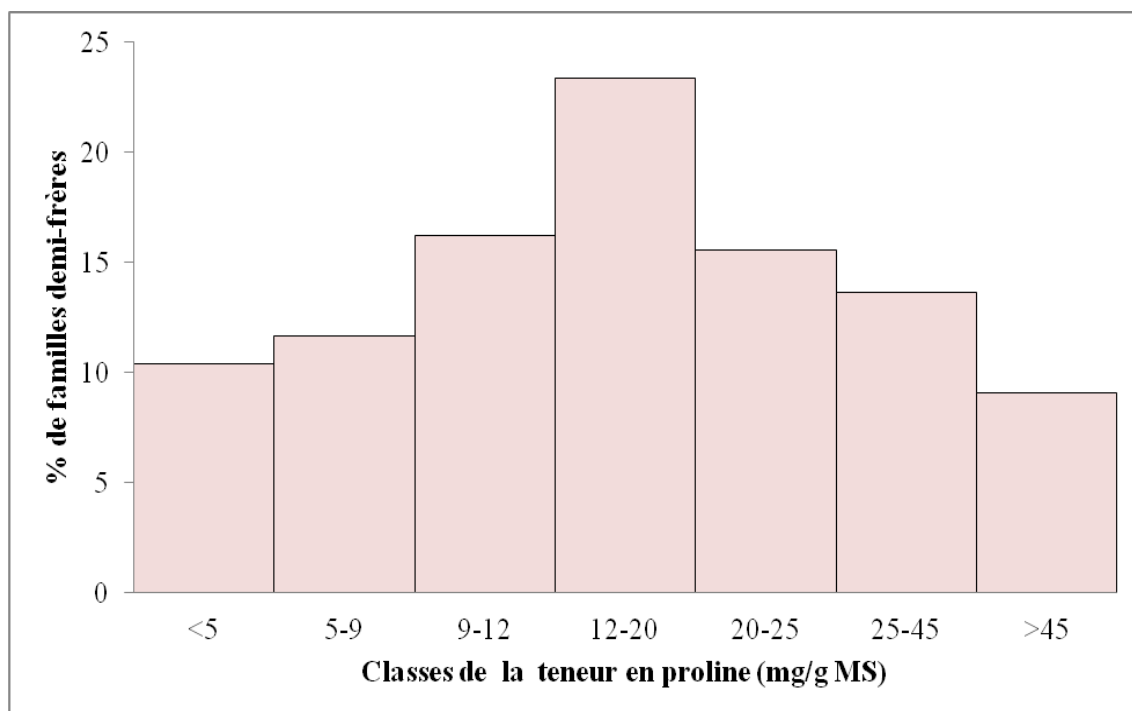


Figure 16. Distribution des familles demi-frères selon l'accumulation de la proline au niveau des feuilles

III- 5 Teneur en sucres solubles

L'accumulation des sucres solubles est l'un des mécanismes les plus remarquables du stress hydrique. D'après l'analyse de la variance (ANOVA), l'accumulation des sucres solubles présente une variation hautement significative entre les familles demi-frères. Cette accumulation a oscillé entre 2,58 et 146,90 mg/g de MS chez les familles demi-frères 26 et 85 respectivement. Environ 11% de familles demi-frères présente une accumulation faible des sucres solubles (inférieure à 15mg/g de MS, par contre 10% de familles ayant une importante accumulation des sucres (supérieure à 100 mg/g de MS) (figure 17).

Le test de Student-Newman-keuls a permis de déceler 63 groupes homogènes de teneur en sucres solubles.

L'accumulation des sucres solubles est un moyen adopté par les plantes en cas de stress, afin de résister aux contraintes du milieu (Loretto *et al.*, 2001). Les sucres solubles sont des indicateurs des degrés de stress, à cause de son importante augmentation lors de la sévérité,

les sucres métaboliques (glucose, galactose, saccharose, et fructose) permettent la résistance aux différents stress (Zerrad *et al.*, 2006).

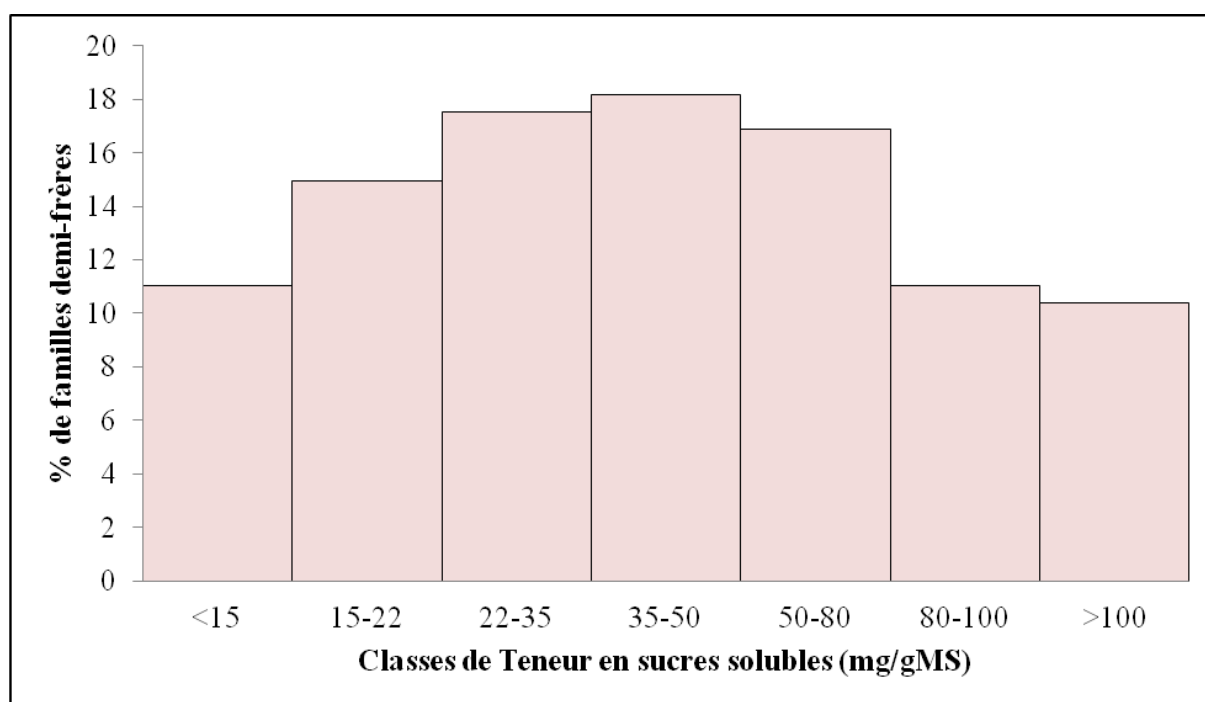


Figure 17. Distribution des familles demi-frères selon l'accumulation des sucres solubles au niveau de leurs feuilles.

III- 6 Corrélation entre les paramètres biochimiques

Cinq corrélations significatives ont été notées entre les paramètres biochimiques étudiées (tableau 8). L'accumulation de la proline au niveau des feuilles est négativement corrélée avec les teneurs chlorophylle et en sucres solubles. La teneur en chlorophylle est positivement avec les teneurs en sucres solubles et les protéines. Enfin, la teneur en sucres solubles est positivement corrélée avec celle des protéines.

Tableau 8. Corrélation entre les paramètres biochimiques étudiés

	Proline	Chlorophylle	Sucres soluble	Protéines
Proline	1	-0.129**	0.074 NS	-0.257**
Chlorophylle		1	0.232**	0.430**
Sucres solubles			1	0.209**
Protéines				1

NS : non significatif

Nous avons trouvé une corrélation positive entre le rendement en matière verte et les teneurs en proline, en chlorophylle et en sucres solubles. Ces mêmes paramètres sont corrélés négativement avec le taux de mortalité des plantes de luzernes (tableau 9). Par conséquent, les familles demi-frères présentant un bon potentiel fourrager ont montré une bonne persistance au stress hydrique estival qui s'est traduite par des taux de mortalité faible. En outre, ces familles demi-frères ont montré des teneurs élevées en deux osmotocums (proline et sucre soluble) qui sont deux indicateurs à la tolérance au stress hydrique. En effet, l'ajustement osmotique apparaît aujourd'hui comme un mécanisme majeur d'adaptation à la sécheresse, il peut intervenir à tous les stades du développement (Monneveux et Thise, 1992), et pour maintenir la balance de la force osmotique, après la chute du potentiel hydrique causée par le stress hydrique, les plantes accumulent un certain nombre d'osmotocums tel que la proline, les ions inorganiques, les carbohydrates et la bétaine (Casals, 1996 ; Wang et al., 2003 ; Wang et al., 2004) qui, en association avec d'autres facteurs tels que la réduction de la transpiration par la fermeture des stomates et la réduction de la surface foliaire (Karrou *et al.*, 2001), permettent de garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevé que possible (Wang *et al.*, 2003).

Tableau 9. Corrélation entre les paramètres biochimiques et le rendement en matière verte et taux de mortalité de plantes après application du stress hydrique

	Proline	Chlorophylle	Sucres soluble	Protéines
Matière Verte	0.132**	0.199**	0.244**	-0.056 NS
% de mortalité des plantes après application du stress hydrique	-0.134**	-0.158**	-0.290**	0.064 NS

NS : non significatif

IV. Les familles demi-frères à sélectionnées

Tableau 10. Les familles demi-frères qui semblent à être sélectionnés

Caractères	Familles demi- frères correspondantes
Rendement en matière verte	44, 109, 87, 23, 27, 9, 113, 119, 77, 36, 79 19, 90, 76, 88, 17, 41, 61, 50, 67, 16, 46, 108, 48, 86, 135, 34, 117, 122, 82, 102, 58
Taux de mortalité	29, 37, 24, 66, 103, 113, 76, 2, 135, 79, 1, 35, 43, 118, 34, 61, 91, 11, 109, 36, 84, 41, 153, 134, 80, 123, 81, 54, 136, 145, 144, 107, 96, 74, 117, 28, 72, 138, 11
La hauteur de la tige principale	9, 96, 102, 107, 114, 81, 110, 80, 104, 78, 129, 136, 13, 65, 92, 56, 30, 28, 58, 66, 115, 120, 130, 74, 125, 128, 15, 77, 93, 113, 44, 72, 131, 27, 37, 57, 82, 127
La surface foliaire	44, 73, 75, 124, 8, 29, 102, 54, 90, 82, 105, 153, 80, 47, 17, 53, 2, 133, 52, 3, 77, 14, 42, 148, 119, 99
Le déficit de saturation hydrique	16, 2,73, 14, 135, 119, 150, 63, 18, 40, 4, 136, 92, 151, 19, 104, 52, 77, 69, 147, 24, 139, 33, 116, 6, 59, 86, 23, 51, 62, 109, 130, 124, 95, 32, 81, 138, 46, 115, 121, 48, 123, 83, 137
Le potentiel hydrique	28; 2, 140, 100, 115, 42, 78, 146, 1, 4, 45, 56, 71, 84, 87, 97, 142, 80, 103, 109, 86, 101, 49, 95, 10, 92, 93, 96, 139
La conductance stomatique	106, 130, 146, 10, 150, 92, 122, 71, 95, 60, 128, 78, 137, 67, 107, 4, 115, 58, 56, 86 124, 94, 51, 99, 30, 101, 54, 154
La fluorescence chlorophyllienne	58, 40, 128, 20, 137, 10, 56, 43, 78, 50 120, 64, 9, 14, 95, 81, 77, 150
La teneur en chlorophylle	147, 125, 90, 129, 152, 83, 131, 40, 68, 38, 112, 127, 41, 133, 116, 7, 98, 89, 87, 5, 65, 117, 17, 44, 109, 13, 61, 153
La teneur en protéines totaux	32, 151, 119, 99, 4, 61, 79, 41, 65, 112, 34 67, 83, 152, 3, 109, 28, 90, 133, 63, 98, 137, 44,37, 51, 113, 24, 14
La teneur en sucres solubles	26, 154, 136, 111, 89, 17, 119, 9, 93, 36, 29, 53, 128, 37, 82, 117, 104, 78, 35, 18, 98, 65, 84, 120, 135, 67, 2, 110, 19, 5, 49, 39, 54, 97, 48, 138, 28, 139,122, 114
La teneur en proline	138, 88, 66, 34, 3, 68, 77, 11, 28, 118, 46, 37, 152, 5, 94, 7, 112, 38, 12, 31, 44, 49, 13, 64, 117, 139, 43, 48, 67, 98, 56, 113, 26, 81

CONCLUSION

Nous avons évalué la tolérance aux stress hydrique estivale, sous les conditions du champ, de 154 familles demi-frères issus d'un croisement entre trois cultivars de luzerne. Ceci à travers l'analyse de certains paramètres agronomiques, physiologiques et biochimiques liés à la tolérance au stress hydrique.

Les résultats obtenus ont montré que la majorité des familles demi-frères de la luzerne présentent des variations significatives pour la majorité des paramètres agronomiques, physiologiques et biochimiques étudiés.

Pour les paramètres agronomiques, nous avons noté que 3,24% de familles demi-frères ont un bon rendement fourrager qui dépasse 1,8 kg/m², et environ 10% des familles demi-frères ont montré une bonne persistance au stress estival au terme du taux de mortalité. La hauteur de la tige principale a dépassé 68 cm chez 11% des familles demi-frères.

Pour les paramètres physiologiques, nous avons noté que 10% de familles présentent 5% de déficit de saturation hydrique, et 17% de familles ont montré une conductance stomatique qui dépasse 25 mmol H₂O/m²s et 12% de familles demi-frères ont un rendement quantique qui dépasse 0,8. En plus, nous avons noté une corrélation positive entre le déficit de saturation hydrique et le potentiel hydrique, d'une part, et entre la fluorescence chlorophyllienne et la conductance stomatique d'autre part.

Concernant les paramètres biochimiques, nous avons noté l'existence des différences hautement significatives entre les familles demi-frères de luzerne testées pour tous les paramètres biochimiques étudiés. En outre, nous avons trouvé une corrélation positive entre le rendement en matière verte et les teneurs en proline, en chlorophylle et en sucres solubles. Ces mêmes paramètres sont corrélés négativement avec le taux de mortalité des plantes de luzernes. Par conséquent, ces paramètres constituent de bons indicateurs qui peuvent nous aider pour la sélection des familles demi-frères tolérant le stress hydrique estival. On a constaté que les familles 44, 109, 135, 88, 113, 61, 79, 82, 80, 96, 136, 117, 112, 123, 124, semblent être les plus tolérantes au stress hydrique estival au terme de tout les paramètres

étudiés. Ces familles demi-frères sélectionnées vont être utilisées comme parents d'une variété synthétique.

PERSPECTIVES

A la lumière des résultats trouvés, nous proposons dans l'avenir l'analyse d'autres paramètres physiologiques et biochimiques complémentaires :

- Une analyse minérale des plantes pour mieux comprendre l'effet de la contrainte hydrique estival sur l'accumulation des minéraux essentiellement le potassium et le sodium.
- Evaluation de l'effet du déficit hydrique sur les teneurs en azote et en phosphore.
- Dosage des autres métabolites qui pourraient intervenir dans les processus d'osmorégulation à savoir la glycine bêtaïne.
- Evaluation de l'effet du déficit hydrique estival sur les activités des enzymes intervenant dans les différents processus métaboliques : Peroxydases, Superoxyde dismutase.

REFERENCES

- **Acevedo, E., Conesa, A.P., Monneveux, P. and Srivastava, J.P., (1989).** Physiology-breeding of winter cereals for stressed Mediterranean environments. INRA Settat, pp: 50-66.
- **Acevedo, E., Fereres, E., Hsiao, T.C., Henderson, D.W., (1979).** Diurnal growth trends, water potential and osmotic adjustment of maize and sorghum leaves in the field. *Plant physiology*. 64: 476-480.
- **Ackerson, R.C., (1981).** Osmoregulation in cotton in response to water stress. Leaf carbohydrate status in relation to osmotic adjustment. *Plant physiology*. 67 : 489-493.
- **Addington R.N., Donovan L.A., Mitchell R.J., Vose J.M., Pecot S.D., Jack S.B., Hacke U.G., Sperry J.S., Oren R., (2006).** Adjustments in hydraulic architecture of *Pinus palustris* maintain similar stomatal conductance in xeric and mesic habitats. *Plant Cell Environ*, 29:535–545.
- **Anjum F., Yaseen M., Rasul E., Wahid A., and Anjum S., (2003).** Water stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). I. Effect on morphological characters. *Pakistan J. Agric. Sci.*, 40: 43–44.
- **Antolín M.C., and Sánchez-Díaz M., (1993).** Effects of temporary droughts on photosynthesis of alfalfa plants. *J. Exp. Bot.*, 44:1341–1349.
- **Aranjuelo M. I., Irigoyen J. J., and Diaz M. S., (2001).** Effect of increased temperature and drought associated to climate change on change on productivity of nodulated alfalfa. En. XIV Eucarpia Medicago SPP. Group Meeting. Quality in Lucerne and Medics for animal production. 2001. Zaragoza.
- **Arnon, D.I., (1949).** Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol-oxydase in *Beta vulgaris* L., *Plant Physiol*. 24:1-15.
- **Awad O., Abusuwar et Ahmed A.B, (2011).** Effect of different chemical fertilizers on growth, nodulation and yield of alfalfa under stress environment of Mecca District, KSA. *agriculture and biology journal of north america*. pp: 2151-7517.
- **Bai W., M. and Li L. H., (2003).** Effect of irrigation methods and quota on root water uptake and biomass of alfalfa in the Wulanbuhe sandy region of China. *Agr. Water Manage.*, 62:139148.
- **Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J.M. (2001).** Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant. Sci*. 160: 669-681.
- **Benabderrahim M.A., Haddad M. et Ferchichi A., (2008).** Essai d'adaptation de 16 cultivars de luzerne pérenne (*Medicago sativa* L) dans un système oasien du sud tunisien : Gabes (local) et 15 cultivars étrangers. *Option méditerranéennes*. Série A, N° 79. CIHEM, 419- 422.
- **Bethenod, O., Daudet, F.A., Castell, J.F., Maillard, P., (1996).** Hypothèses et principes de la représentation de la diffusion du CO₂ à différentes échelles, de la feuille au couvert. In : De la plante au couvert végétal, Inra bioclimatologie, pp. 129-135.
- **Bhatt R.M., and Srinivasa Rao N.K., (2005).** Influence of pod load response of okra to water stress. *Indian J. Plant Physiol.*, 10: 54– 59.

- **Birouk A., (1989).** Collecte de populations traditionnelles de luzerne au Maroc: Caractérisation pédoclimatique des régions prospectées et recherche de caractères adaptatifs. *Plant. Genet. Resour. Newsl.*
- **Birouk A., Bouizgaren A., et Baya B., (1997).** La luzerne (*Medicago sativa*). « Production et utilisation des cultures fourragères au Maroc», G. Jaritz et M. Bounejmate édition INRA, Rabat, Maroc. pp: 126-139.
- **Blum A (1988).** 'Plant breeding for stress environments.' (CRC Press: Boca Raton, FL)
- **Blum A., (1989).** Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Science*, 29: 230–233.
- **Bois J.F., (1993).** Effet de la contrainte hydrique sur la photosynthèse du Mil. ORSTOM (Colloques et Séminaires), pp:161-168.
- **Bouizgaren A., (2007).** Fiche technique sur la culture de la luzerne au Maroc, technique de production fourragère et semencière. Edition INRA 2007.
- **Bouizgaren A., Farissi M., Ghoulam C., Kallida R., Faghire M., Barakate M., Al Feddy M.N., (2011).** Assessment of summer drought tolerance variability in Mediterranean alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars under Moroccan fields conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 10: 1–14.
- **Bradford, M.M., (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing The principle of protein dye binding. *Anal. Bioch.* 72: 248-257.
- **Bray E., Bailey-Serres J. et Weretinsky E., (2000).** Responses to abiotic stresses In: *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. Buchanan W, Gruissem W, Jones R, Eds. 2000 American Society of plant physiologists, pp: 1158-1203.
- **Broderick G.A., (2001).** Maximizing utilization of alfalfa protein; the example of the lacting dairy cow. *Options Méditerranéennes*. 45: 183-192.
- **Brown, P.W. and Tanner, C.B., (1983).** Alfalfa stem and leaf growth during water stress. *Agro*, 75: 779-804.
- **Buxton D.R., (2004).** Growing quality forages under variable environmental conditions, USDA, Iowa State University, USA.
- **Campiglia E., Caporali F., Barberi R., Mancinelli R., (1999).** Influence of 2-, 3-, 4- and 5 – year stands of alfalfa on winter wheat yield. In: Olesen JE, Eltun R, Goodlimg MJ, Jensen ES, Kopke U, editors. *Proc. Int. Workshop 'Designing and Testing Crop Rotations for Organic Farming'*. DARCOF, Tjele, DK, pp: 165–171.
- **Caratini R., (1984).** Les plantes. Bordas, Paris
- **Casals, M.L., (1996).** Introduction des mécanismes de résistance à la sécheresse dans un modèle dynamique de croissance et de développement de blé dur. *Thèse de doctorat en agronomie*, INRA Paris Grignon, 86 pages, pp: 9-14.

- **Chaibi, W., (1999).** Etude physiologique ultrastructurale et cytoenzymologique de l'effet de chlorure de sodium chez *Medicago sativa* L. (cultivar Gabès). Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de Tunis.
- **Chebouti A., Abdelguerfi A., et Mefti M., (2000).** Effet du stress hydrique sur le rendement en gousses et en graines chez trois espèces de luzernes annuelles: *Medicago aculeata*, *Medicago orbicularis* et *Medicago truncatula*. Ed. INRA d'Algérie.
- **Chebouti A., et Abdelguerfi A., (2002).** Etude de l'effet du déficit hydrique sur le développement et le rendement fourrager chez quatre populations *Medicago truncatula*. INRA d'Algérie, GAERTN, Revue semestrielle, 10: 27-31.
- **Christian R., (1977).** Effect of environment on the growth of alfalfa. *Adv. Agro.*, 29: 189-227.
- **Collin F. et L. Brun L. avec la participation de Deneufbourg F., Broucsault LM., Hacquet J., Wohrer J. et Lizot JF., (2003).** Produire des semences de luzerne dans un itinéraire agrobiologique. ITAB, édition Paris.
- **Cornic, G., Massaci, A., (1996).** Leaf photosynthesis under drought stress. In: Photosynthesis and the environment, pp. 347-360.
- **Craufurd P.Q., Prasad P.V.V., Kakani V.G., Wheeler T.R., Nigam S.N., (2003).** Heat tolerance in ground nut. *Field Crop Res.* 1: 63-771.
- **De Ronde, J.A., Laurie, R.N., Caetana, T., Greyling, M.M., Kerepsil., (2004).** Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant. *Euphytica*. 138 : 123-132.
- **Earl H., and Davis R.F., (2003).** Effect of drought stress on leaf and whole canopy radiation use efficiency and yield of maize. *Agron. J.*, 95:688-696.
- **Erice G., Louahlia S., Irigoyen J.J., Sánchez-Díaz et Avicé J.C., (2010).** Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of Plant Physiology*. 38: 114-120.
- **FAO., (1988).** Programme de coopération technique. Programme de développement des productions fourragères et de l'élevage. Rapport de synthèse, 45 p.
- **Farissi M., Bouizgaren A., Faghir M., Bargaz A., Ghoulam C. (2013).** Agrophysiological and biochemical properties associated with tolerance of *Medicago sativa* population to water deficit, Turkish journal of botany(In Press).
- **Farooq M., Basra S.M.A. Wahid A., Cheema Z.A, Cheema M.A., and Khaliq A., (2008).** Physiological role of exogenously applied glycinebetaine in improving drought tolerance of fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agron. Crop Sci.*, 194: 325–333
- **Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. (2009).** Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.*, 29: 185–212.
- **Ford, C.W., Wilson, J.R., 1981.** Changes in levels of solutes during osmotic adjustment to water stress in leaves of four tropical pasture species. *Plant physiology*. 8: 79-91.
- **Freyer B., F. Dmytro K., Roman D., Fedoseyenko D., Irina K., and Anatoliy K., (2005).** Biological nitrogen fixation of different legume species under water stress – Greenhouse experiment. Poltava Agrarian Academy, Poltava, 36003. 23 pp.

- **Fussel L.K., Biokirg F.R., et Bielev P., (1991).** Crop physiology and breeding for drought tolerance research and development. *Field crop Res.* 27, pp: 183-199.
- **Galau, G., Close, T.J., 1992.** Sequence of the cotton group 2 LEA/ RAB/ dehydrin proteins encoded by *lea3* cDNAs. *Plant physiology.* 98: 1523-1525.
- **Girousse C., Bournoville R., Bonnemain J.L., (1996).** Water deficit induced changes in concentration in proline and some other amino acids in phloem sap of Alfalfa. *Plant Physiol*, 111:109-113.
- **Grimes D.W., Wiley P.L., Sheesley W.R., (1992).** Alfalfa yield and plant water relations with variable irrigation. *Crop Sci*, 32: 1381-1387
- **Hamidi H., and Safarnejad A., (2010).** Effect of Drought Stress on Alfalfa Cultivars (*Medicago sativa* L.) in Germination Stage. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 8 (6): 705-709.
- **Harris D., Tripathi R.S., Joshi A., (2002).** On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice. In: *Direct seeding: Research Strategies and Opportunities*. International Research Institute, Manila Pandey S., Mortimer M., Wade L., Tuong T.P., Lopes K., Hardy B. (Eds.), , Philippines, pp: 231–240.
- **Hassani A., Dellal A., Belkhodja M. et Kaid- Harche M., (2008).** Effet de la salinité sur l'eau et certains osmolytes chez l'orge (*Hordeum vulgare*). *European Journal of Scientific Research*, vol.23, 1, pp: 61-69.
- **Hireche Y., (2006).** Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L.) au stress hydrique et à la profondeur de semis. *Mémoire de Magistère en Sciences Agronomiques. Univ. El Hadj Lakhdar-Batna, Algérie.*
- **Huyghe C., (2003).** Les fourrages et la production de protéines. *Fourrages*. 174: 145-162.
- **Jaleel C. A., Gopi R., Sankar B., Gomathinayagam M., and Panneerselvam R., (2008).** Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *C. R. Biologies*, 331:42-47.
- **Jaleel C. A., Wang G., Ahmad P., Ikram-ul-Haq (2009).** Changes in the photosynthetic characteristics of *Catharanthus roseus* L. as a result of exogenous growth regulators. *Plant Omics Journal*, 2(4):169-174.
- **Janati, A., (1990).** Les cultures fourragères dans les oasis marocains. *Cahiers Options méditerranéennes*, Vol. 11: 163-169.
- **Julier B., Huyghe C., (2010).** Quelles légumineuses fourragères (espèces et variétés) et quelles conduites pour améliorer l'autonomie protéique des élevages herbivores ?, *Innovations Agronomiques*, Vol. 11 : 79-99.
- **Katerji N., Van Hoorn J.W., Hamdy A., Mastrorilli, M. and Mou Karzel E., (1997).** Osmotic adjustment for sugar beets in response to soil salinity and its influence on stomatal conductance, growth and yield. *Agricul. Water Manag.* 34: 57-69.
- **Kavar T., Maras M., Kidric M., Sustar-Vozlic J., Meglic V., (2007).** Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Mol. Breed.* 21: 159–172.

- **Kaya M.D., Okçub G., Ataka M., Çıkkılıç Y., Kolsarıcıa Ö., (2006).** Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Eur. J. Agron.* 24: 291–295.
- **Kiani S.P., Maury P., Sarrafi A., and Grieu P., (2008).** QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus L.*) under well-watered and water-stressed conditions. *Plant Sci.*, 175: 565–573
- **Kusaka M., Ohta M., and Fujimura T., (2005).** Contribution of inorganic components to osmotic adjustment and leaf folding for drought tolerance in pearl millet. *Physiol. Plant.*, 125: 474–489.
- **Laouar M., Kiès N., Abdellaoui K., Bennour A., Bettahar N., Kadi S., Bouzza L., (2001).** Effet du stress hydrique sur le comportement physiologique de dix populations de *Medicago intertexta*. *Options Méditerranéennes: Série A*, pp: 167-171.
- **Latrach L, Farissi M, Mouradi M, Makoudi B, Bouizgaren A., Ghoulam C. 2014.** Growth and nodulation in alfalfa-rhizobia symbiosis under salinity: effect on electrolyte leakage, stomatal conductance and chlorophyll fluorescence. *Turk J Agric For* doi: 10.3906/tar-1305-52.
- **Lemaire G., 2006.** La luzerne : productivité et qualité. Dans : Workshop international sur la diversité des fabacées fourragères et leurs symbiotes : applications biotechnologiques, agronomiques et environnementales. Alger. A. Abdelgeurfi (ed). 174-182.
- **Linné Carl von., (1753).** Species Plantarum, Holmia, impensis L. Salvii.
- **Loreti E, De Bellis L, Alpi A, Perata P (2001).** Why and how do plant cells sense sugars? *Annals Bot* 88: 803-812.
- **Massaci A., Nabiev S.M., Petrosanti L., Nematov S.K., Chernikova T.N., Thor K., and Leipner J., (2008).** Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum L.*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol. Biochem.* 46:189-195.
- **Matthias W., and Smith S. E., (1997).** Morphological and physiological characteristics associated with tolerance to summer irrigation termination in alfalfa. *Crop Sci.*, 37:704-711.
- **Mauriès M., (1988).** Module de production et de gestion de système fourrager. Cahier luzerne, C.E.E.
- **Mauriès M., (1994).** La luzerne aujourd'hui. *Edition France agricole*. p : 254.
- **Mc Ainsh MR, Clayton H, Mansfield TA, Hetherington AM (1996).** Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol* 111:1031-1042.
- **Mo Y., Liang G., Shi W., et Xie J., 2011.** Metabolic responses of alfalfa (*Medicago Sativa L.*) leaves to low and high temperature induced stresses. *African Journal of Biotechnology*. 7: 1117-1124.

- **Moise, L., 1976.** Luzerne et facteur climatique. Mémoire stagiaire au CIGREF, groupement de Bordeaux, p: 342.
- **Monneveux P., and Thise D., (1997).** La génétique face aux problèmes de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse: espoirs et difficultés. *Sécheresse*, 8 (1): 29-37.
- **Morgan J.M., Hare R.A., and Fletcher R.J., (1986).** Genetic variation in osmo-regulation in bread in durum wheat and its relationship to grain yields in a range of field environments. *Aust. J. Agric. Res.*, 37: p. 449-457.
- **Muller, J., Boller, T., Wiemken, A., 1996.** Pools of non structural carbohydrates in soybean root nodules during water stress. *Physiol. Plant.* 98 : 723-730.
- **Nguyen ST. et R.Paquin., 1971.** Méthodes d'extraction et de purification des acides aminés libre et des protéines des tissus végétaux. *J.Chromatography*, 61, p. 34951.
- **Nie A., and Norton M.R., (2009).** Stress Tolerance and Persistence of Perennial Grasses: The Role of the Summer Dormancy Trait in Temperate Australia. *Crop Science*. 49:2405-2411
- **Oren R., Sperry J.S., Katul G.G., Pataki D.E., Ewers B.E., Phillips N., Schafer K.V.R., (1999).** Survey and synthesis of intra- and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant Cell Environ*, 22:1515–1526.
- **Oukarroum A, El Madidi S, Strasser RJ. 2012.** Exogenous glycine betaine and proline play a protective role in heat-stressed barley leaves (*Hordeum vulgare* L.): A chlorophyll a fluorescence study. *Plant Biosyst* 146(4): 1037–1043.
- **Pastori GM, Foyer CH (2002).** Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of “Redox” and Absciscic Acid-Mediated Controls *Plant Physiology* 129:460-468. *Physiol* 131: 872–877.
- **Pecetti L., Annicchiarico P., Abdelguerfi A., Kallida R., Mefti M., Porqueddu C., Simões N.M., Volaire F., Lelièvre F., (2010).** Response of Mediterranean Tall Fescue Cultivars to Contrasting Agricultural Environments and Implications for Selection. *J. Agronomy & Crop Science*. 197:12-20.
- **Peng Z., Lu Q., Verma D.P.S., (1996).** Reciprocal regulation of Delta (1) pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet.*, 253:334-341.
- **Penhouet R., 2008.** La luzerne. Département Agronomique-Machinisme de la chambre d'agriculture Maine-Loire N° 26.
- **Pham Thi, A.T., 1976.** Quelques aspects de l'influence de la carence hydrique sur la photosynthèse, la photorespiration et la respiration obscure chez deux espèces de cotonnier l'une résistante à la sécheresse, l'autre sensible. Thèse de doctorat. Université de paris VII.
- **Rekika DJ., (1997).** Identification et analyse génétique des caractères physiologiques liés au rendement en condition de sècheresse chez le blé dur. Intérêt potentiel des espèces sauvages apparentées pour l'amélioration de ces caractères. *Thèse de doctorat. ENSA de Montpellier*. 158 p.
- **Riccardi, F., Gazeau, P., De Vienne, D., Zivi, M., 1998.** Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. *Plant physiology*. 117: 125-126.

- **Roussos Peter A. 2013.** Growth and biochemical responses of jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneid) explants cultured under mannitol-simulated drought stress in vitro. *Plant Biosyst* 147(2): 272–284.
- **Russelle, M. 2001.** Alfalfa. *American Science* 89: 252-259.
- **Saeed I.A.M., and EL-Nadi A.H., (1997).** Irrigation effects on growth, yield and water use efficiency of alfalfa. *Irrig. Sci.*, 17(2)63-68.
- **Safarnejad A, Collin HA, Bruce KD, McNeilly T. 1996.** Characterization of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following In vitro selection for salt tolerance. *Euphytica* 92: 55–61.
- **Sangsing K., Kasemsap P., Thanisawanyangkura S., Sangkhasila K., Gohet E., Thaler P., Cochard H., (2004).** Xylem embolism and stomatal regulation in two rubber clones (*Hevea brasiliensis* Muell Arg). *Trees*, 18:109–114.
- **Schoutteten F., 2004.** Fiche technique agro-industrie. *Edition Juin* 2004. p 3.
- **Seyed, Y.S.L., Rouhollah, M., Mosharraf, M.H., Ismail, M.M.R., 2012.** Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses, Water Stress, Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-963-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/water-stress/water-stress-inplants-causes-effects-and-responses>.
- **Shao H.B., Chu L.Y., Shao M.A., 2008.** Calcium as a versatile Plant Signal Transducer under Soil Water Stress. *BioEssays*. 30: 634-641.
- **Shao H.B., L.Y., Chu M.A., Shao C., Abdul Jaleel and Hong-Mei M., (2008).** Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comp. Rend. Biol.*, 331: 433–441.
- **Sinclair T. R., and Ludlow M. M., (1985).** Who Taught Plants Thermodynamics? The Unfulfilled Potential of Plant Water Potential. *Australian Journal of Plant Physiology* 12(3) 213 – 217.
- **Singh, T.N., Paleg, L.G., et Aspinall, D., 1973.** Stress metabolism III : Variation in reponse water deficit in the barley plant. *Aust.J.biol. Sci.*26, pp: 56-76.
- **Sperry J.S., Adler F.R., Campbell G.S., Comstock J.P., (1998).** Limitation of plant water use by rhizosphere and xylem conductance: results from a model. *Plant Cell Environ*, 21:347–359
- **Steinmetz F.H., (1926).** Winter hardness in alfalfa varieties. *Uni. Minnesota Tech. Bull.* 38.
- **Tardieu F., Cruiziat P., Durand JL., Triboï E., Zivy M. (2006)** Perception de la sécheresse par la plante. Conséquences sur la productivité et sur la qualité des produits récoltés ESCo "Sécheresse et agriculture"– Chapitre 1.1. pp 49-67.
- **Thiebeau P., Parnaudeau V., Guy P., 2003.** Quel avenir pour la luzerne en France et en Europe ? *Courrier de l'environnement de l'INRA*. 49: 29-46.
- **Trouverie J, Thévenot C, Rocher J-P, Sotta B, Prioul J-L (2003).** The role of Absciscic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *Journal of Experimental Botany* 54:2177-2186.
- **Turner N.C., Wright G.C., Siddique K.H.M. (2001).** Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. *Adv. Agron.*, 71: 123–231.
- **Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002)** Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell and Environment* 25:173-194.

- **Undersander D., Hall M.H., Vassalotti P., Cosgrove D., 2011.** Alfalfa germination and growth. pp: 23.
- **Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.K. (2006).** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant J.*, 45: 523-539.
- **Vincent, D., Lapierre, C., Pollet, B., Cornic, G., Negroni, L., Zivy, M. 2005.** Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant physiology*. 137: 949-960.
- **Vitale L, Arena C, Virzo De Santo A. 2012.** Seasonal changes in photosynthetic activity and photochemical efficiency of the Mediterranean shrub *Phillyrea angustifolia* L. *Plant Biosyst* 146(2): 443–450.
- **Wahid A., Rasul E., (2005).** Photosynthesis in leaf, stem, flower and fruit. In: Handbook of Photosynthesis Pessaraki M. (Ed.), 2nd ed., CRC Press, Florida, pp. 479–497.
- **Wang S., Wanb C., Wang Y., Chen H., Zhou Z., Fu H., and Sosebee R.E., (2004).** The characteristics of N^{a+} , K^{+} and free proline distribution in several drought-resistant plants of the Alxa Desert, China. *Journal of Arid Environments*, 56: 525–539.
- **Wang W.X., Brak T., Vinocur B., Shoseyov O., and Altman A., (2003).** Abiotic resistance and chaperones: possible physiological role of SP1, a stable and stabilising protein from *Populus*. In: *Plant biotechnology and beyond*. Vasil IK (ed), 2000. Kluwer, Dordrecht, pp: 439-443.
- **William G.H. et Charles-Marie E., 2003.** *Physiologie végétale*. Boeck Université, p 456.
- **Wu C., Wang Q., Xie B., Wang Z., Cui J., and Hu T., (2011).** Effects of drought and salt stress on seed germination of three leguminous species. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10 (78): 17954-17961.
- **Yang C.W., Kao C.H., (1999).** Importance of ornithine- α -aminotransferase to proline accumulation caused by water stress in detached rice leaves. *Plant Growth Reg.*, 27:189-192.
- **Yoshida Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., (1997).** Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol*, 38:1095-1102.
- **Zerrad W., Maataoui B.S, Hilali S., El Antri S. et Hmyene A., (2008).** Etude comparative des mécanismes biochimiques de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur. *Lebanese Science Journal*, 9 (2): 27-36.
- **Zhao C.X., Deng X.P., Zhang S.Q., Ye Q., Steudle E., Shan L., (2004).** Advances in the studies on water uptake by plant roots. *J. Integr. Plant. Biol.*, 46: 505-514.
- **Zhu J.k., 2001.** Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:401–406.

ANNEXES

Annexe 1 :

- Tompon Tris-HCL 0,1 M

Tris	121,1 g
pH	7,5
HCl	
Eau distillé	Ajuster jusqu'à 1L

Annexe 2 :

- Réactif de Bradford (1L)

Bleu de coomassie	100mg
Ethanol à 95%	50 ml
Acide orthophosphorique	100 ml
Eau distillé	ajusté à 1000 ml

Annexe 3

- La gamme étalon pour le dosage des protéines

A partir d'une solution mère de SAB (10 mg/100 ml) on prépare les différentes concentrations :

Tableau : préparation de la gamme étalon pour le dosage des protéines

SAB (µg/ml)	5	10	20	30	40
solution mère	0,5	1	2	3	4
eau distillée	9,5	9	8	7	6

Annexe 4

- Solution de ninhydrine (1L)

Ninhydrine	20 g
Acide Orthophosphorique H ₃ PO ₄ 6M	400 ml
Acide acétique glacial	600 ml

Annexe 5 :

• La gamme étalon pour le dosage de proline :

A partir de la solution mère de proline (100mg/l), on prépare une solution fille de concentration 20µg/ml en suspendant 100ml de la solution mère dans 400ml d'eau distillée. Une série de dilution de 15 ; 10 et 5µg/l ont été faites à partir de la solution fille de proline.

Tableau : préparation de la gamme étalon pour le dosage de proline

Concentrations en proline	0 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	15 µg/ml	20 µg/ml
Eau distillée (ml)	10	7,5	5	5	0
Solution fille de proline (ml)	0	2,5	5	7,5	10
Ninhydrine	5ml				
Solution d'acide acétique (ml)	5ml				
Ebullition á 100°C (ml) pendant 45 min					

Annexe 6 :

• Solution d'anthrone

Anthrone 1,5 g

Acide sulfurique 72% 1000 ml

Annexe 7 :

• La gamme étalon pour le dosage des sucres solubles

A partir d'une solution mère de glucose 0,2g/l on prépare les différentes concentrations : 0, 20, 40, 60 et 80 µg/ml.

Tableau : préparation de la gamme étalon pour le dosage des sucres solubles

Concentration en glucose	0 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml
Eau distillée (ml)	10	9	8	7	6
Solution mère de glucose (ml)	0	1	2	3	4
Anthrone	3ml				
Ebullition á 100°C (ml) pendant 10 min					

Annexe 8 :

Tableau. Les familles demi-frères intervenant dans les différentes classes de rendement en matière verte

Classes	<0,60	0,60-0,70	0,70-0,80	0,80-1	1-1,2	1,2-1,35	1,35-1,6	1,6-1,8	>1,8
Familles demi-frères de luzerne	141, 1, 104, 127, 68, 144, 6, 55, 142, 91	10, 51, 133, 154, 20, 78, 125, 83, 32, 134, 11, 110, 123	96, 75, 100, 103, 145, 24, 85, 150, 120, 94, 139, 111, 42, 13, 131, 56, 128, 115, 112	146, 93, 29, 8, 18, 18, 73, 138, 106, 31, 3, 92, 143, 126, 137, 124, 80, 22, 43, 84, 47, 40, 97, 53, 136, 2	151, 105, 15, 72, 30, 7, 116, 4, 57, 147, 89, 98, 49, 63, 59, 65, 5, 12, 153, 81, 129, 121, 140, 35, 25, 64, 74, 45, 118	132, 14, 152, 26, 130, 38, 95, 62, 114, 33, 149, 70, 28, 99, 37, 148, 66, 69, 54, 39, 60, 71, 21, 101, 107, 52	41, 61, 50, 67, 16, 46, 108, 48, 86, 135, 34, 117, 122, 82, 102, 58	44, 109, 87, 23, 27, 9, 113, 119, 77, 36, 79	19, 90, 76, 88, 17

Tableau. Les familles demi-frères intervenant dans les différentes classes de la hauteur de la tige principale

Classes	<55	55-60	60-61,5	61,5-64	64-66	66-68	>68
Familles demi-frères de luzerne	106, 75, 95, 112, 59, 133, 151, 83, 134, 139, 152, 24, 33	29, 126, 38, 123, 90, 11, 26, 116, 138, 8, 91, 98, 1, 142, 108, 67, 88, 109, 3, 17, 53, 124	7, 51, 52, 132, 144, 150, 18, 23, 34, 41, 71, 46, 62, 97, 22, 35, 79, 140, 143, 148, 21, 63, 145, 153	16, 32, 99, 118, 121, 147, 69, 84, 61, 94, 137, 146, 154, 2, 10, 43, 47, 49, 100, 111, 25, 50, 64, 117, 122, 5, 6, 36, 48, 87, 19, 45, 101, 103	39, 85, 86, 135, 149, 14, 31, 60, 119, 141, 68, 105, 12, 20, 42, 54, 70, 55, 76, 89, 4, 40, 73	28, 58, 66, 115, 120, 130, 74, 125, 128, 15, 77, 93, 113, 44, 72, 131, 27, 37, 57, 82, 127	9, 96, 102, 107, 114, 81, 110, 80, 104, 78, 129, 136, 13, 65, 92, 56, 30

Tableau. Les familles demi-frères intervenant dans les différentes classes du taux de mortalité

Classes	<2,4	2,4-2,8	2,8-3,15	3,15-3,5	3,5-3,8	3,8-4,5	>4,5
Familles demi-frères de luzerne	29, 37, 24, 66, 103, 113, 76, 2, 135, 79, 1, 35, 43, 118, 34, 61	91, 11, 109, 36, 84, 41, 153, 134, 80, 123, 81, 54, 136, 145, 144, 107, 96, 74, 117, 28, 72, 138, 11	65, 142, 13, 141, 21, 139, 71, 151, 18, 47, 51, 38, 90, 16, 7, 48, 9, 122, 132, 108, 56, 10, 94, 129, 73, 98	121, 59, 4, 42, 127, 33, 49, 3, 69, 55, 89, 83, 53, 100, 45, 70, 140, 62, 27, 95, 87, 112, 40, 39, 60, 31, 82, 67, 86, 23, 88	5, 120, 12, 6, 104, 20, 22, 46, 148, 8, 63, 92, 68, 105, 78, 147, 25, 93, 50, 19, 99, 126, 97, 14, 150, 57, 15, 77, 17	114, 75, 44, 137, 64, 152, 32, 106, 101, 116, 119, 102, 146, 143, 111, 115, 124, 30, 154, 85, 52, 133	149, 130, 128, 131, 58, 125, 26

Tableau. Les familles demi-frères intervenant dans les différentes classes de surface foliaire

Classes	<3,5	3,5-4	4-4,8	4,8-5,5	5,5-6,5	6,5-7,4	> 7,4
Familles demi-frères de luzerne	152, 58, 59, 15, 78, 43, 21, 110, 144, 121, 66	5, 92, 38, 72, 65, 134, 31, 39, 61, 108, 12, 16, 19, 112, 154, 11, 57, 142, 140, 70, 10, 68, 139, 91	45, 25, 128, 22, 36, 81, 46, 60, 122, 28, 145, 30, 116, 126, 41, 118, 86, 95, 132, 27, 131, 34, 100, 93, 127, 7	137, 9, 104, 136, 35, 138, 23, 20, 129, 151, 69, 33, 147, 62, 123, 103, 130, 63, 13, 117, 88, 40, 135, 26, 51, 143, 150, 101, 64, 87, 74, 114, 106, 4, 146, 1, 37, 67, 85	89, 96, 113, 94, 71, 76, 50, 49, 98, 79, 107, 84, 83, 109, 111, 18, 97, 115, 24, 48, 32, 55, 56, 141, 149, 120, 6, 125	44, 73, 75, 124, 8, 29, 102, 54, 90, 82, 105, 153, 80, 47, 17, 53, 2, 133, 52, 3	77, 14, 42, 148, 119, 99

Tableau. Les familles demi-frères intervenant dans les différentes classes de conductance stomatique

Classes	<15	15-18	18-25	25-60	60-100	100-120	120-200	>200
Familles demi-frères de luzerne	124, 94, 51, 99, 30, 101, 54, 154	106, 130, 146, 10, 150, 92, 122, 71, 95, 60, 128, 78, 137, 67, 107, 4, 115, 58, 56, 86	134, 45, 48, 47, 72, 26, 12, 132, 82, 114, 35, 97, 135, 141, 93, 102, 104, 9, 28, 21, 53, 32, 13, 20, 29	5, 87, 149, 147, 59, 96, 50, 103, 105, 33, 100, 84, 55, 57, 136, 24, 138, 80, 109, 25, 18, 126, 61, 139, 110, 153, 19, 76, 27, 1, 74	118, 7, 148, 152, 31, 73, 142, 144, 8, 37, 98, 11, 22, 43, 120, 119, 44, 69, 108, 36, 91, 116, 40, 64, 145, 140, 14, 125, 133, 112	111, 42, 63, 143, 151, 123, 129, 3, 90, 41, 127, 121, 16, 17, 46, 83, 79, 113, 65	15, 131, 66, 89, 68, 70, 34, 88, 117, 52, 85, 38, 39, 23	49, 81, 6, 75, 62, 77, 2

Tableau. Les familles demi-frères intervenant dans les différentes classes de DSH

Classes	<5	5-15	15-25	25-40	40-60	>60
Familles demi-frères de luzerne	16, 2,73, 14, 135, 119, 150, 63, 18, 40, 4, 136, 92, 151, 19, 104	52, 77, 69, 147, 24, 139, 33, 116, 6, 59, 86, 23, 51, 62, 109, 130, 124, 95, 32, 81, 138, 46, 115, 121, 48, 123, 83, 137	10, 118, 134, 97, 99, 91, 55, 153, 65, 88, 140, 64, 143, 80, 5, 154, 78, 72, 28, 11, 13, 111, 71, 9, 89, 82,75, 8, 54, 60, 105, 87, 132, 94, 145, 131, 122, 53	120, 26, 41, 85, 45, 38, 103, 56, 108, 15, 107, 144, 76, 93, 44, 117, 68, 126, 114, 42, 50, 113, 29, 149, 148, 102, 142, 7, 49, 90, 84, 66, 127, 1, 61, 37, 36, 125	27, 12, 30, 25, 70, 101, 96, 74, 129, 128, 58, 141, 112, 133, 31, 57, 22, 67, 106, 21, 39, 47, 43, 146, 98, 17,79	3, 152, 100, 110, 34, 20, 35

Tableau. Les familles demi-frères intervenant dans les différentes classes de potentiel hydrique

Classes	< (-2)	(-2)- (-2,5)	(-2.5)- (-3.5)	(-3.5)- (-6.5)	(-6.5)- (-10)	(-10)- (-14)	(-14)- (-24)	(-24)- (-28)	> (-28)
Familles demi- frères de luzerne	28; 2, 140, 100, 115	42, 78, 146, 1, 4, 45, 56, 71, 84	87, 97, 142, 80, 103, 109, 86, 101, 49, 95, 10, 92, 93, 96, 139	47, 76, 61, 91, 33, 143, 106, 149, 57, 19, 8, 135, 145, 124, 24, 43, 67, 110, 114, 77, 50, 73, 13, 107, 128, 59, 69	51, 108, 66, 23, 37, 72, 137, 141, 14, 26, 48, 121, 20, 52, 148, 111, 12, 22, 29, 119, 40, 81, 102, 131, 35, 120, 122, 55, 105, 62, 136, 32, 154	9, 151, 17, 6, 75, 79, 132, 134, 94, 144, 64, 144, 64, 13, 16, 150, 39, 18, 60, 46, 58, 88, 104, 118, 138, 153, 82, 53, 99, 15, 30, 127, 21	89, 152, 125, 3, 147, 113, 90, 63, 68, 133, 5, 34, 112, 41, 98, 38, 83, 117, 65, 123, 31, 126	7, 36, 116, 44, 70, 27, 11	25, 129, 85, 74, 54

Tableau. Les familles demi-frères intervenant dans les différentes classes de fluorescence chlorophyllienne

Classes	<0,2	0,2-0,35	0,35-0,7	0,7-0,75	0,75-0,8	0,8-0,814	>0,814
Familles demi-frères de luzerne	74, 27, 118, 129, 11, 63, 25, 34, 15, 152	38, 36, 16, 116, 5, 7, 46, 31, 68, 3, 17, 126, 125, 41, 131, 85, 127, 90, 83, 65, 113, 98, 147, 22, 133, 44	108, 123, 79, 117, 70, 112, 45, 97, 14, 51, 146, 4, 119, 139, 18, 53, 115, 54, 28, 39, 88, 12, 135, 57, 149, 35, 121, 23, 107, 21, 105	154, 100, 102, 13, 151, 124, 30, 19, 32, 114, 82, 6, 26, 136, 66, 86, 61, 2, 47, 67, 93, 94, 42, 49, 62, 75, 111, 141, 29, 148, 89, 103, 24, 71, 80, 144, 84, 73	92, 8, 99, 76, 143, 52, 145, 122, 109, 48, 37, 72, 130, 91, 59, 87, 110, 60, 55, 153, 1, 101, 96, 142, 134, 69, 106, 33, 138, 140, 132	58, 40, 128, 20, 137, 10, 56, 43, 78, 50	120, 64, 9, 14, 95, 81, 77, 150

Tableau. Les familles demi-frères intervenant dans les différentes classes de la teneur en chlorophylle

Classes	<4,5	4,5-5,5	5,5-7,5	7,5-21	21-24,5	24,5-27,5	>27,5
Familles demi-frères de luzerne	20, 9, 92, 23, 73, 121, 2, 120, 60, 110, 151, 45, 33, 58, 35	138, 101, 96, 81, 122, 47, 6, 37, 57, 77, 114, 4, 8, 93, 111, 56, 119, 64, 146, 84, 132	106, 135, 39, 49, 51, 137, 94, 18, 54, 50, 136, 62, 14, 78, 24, 19, 88, 67, 130, 69, 52, 105, 100, 134, 86, 48, 29, 53	97, 141, 30, 104, 154, 107, 115, 59, 139, 80, 28, 26, 124, 102, 128, 150, 21, 82, 12, 108, 75, 55, 99, 25, 42, 10, 144, 46, 113, 22, 15, 72, 143	1, 149, 145, 76, 103, 142, 91, 79, 71, 85, 95, 27, 31, 3, 74, 148, 43, 118, 63, 32, 34, 123, 11, 70, 36, 16, 140, 126, 66	147, 125, 90, 129, 152, 83, 131, 40, 68, 38, 112, 127, 41, 133, 116, 7, 98	89, 87, 5, 65, 117, 17, 44, 109, 13, 61, 153

Tableau. Les familles intervenant dans les différentes classes de la teneur en protéines

Classes	<6	6-9	9-15	15-29	29-31	31-36	>36
Familles demi-frères de luzerne	26, 58, 111, 48, 106, 110, 132, 154, 92, 8, 49, 59, 104, 62	77, 146, 60, 134, 96, 69, 80, 54, 88, 21, 47, 30, 87, 57, 141, 121, 81, 94, 9, 19, 97, 153, 73	6, 138, 78, 136, 56, 20, 101, 72, 45, 12, 124, 23, 93, 115, 120, 2, 82, 100, 128, 139, 10, 86, 53, 122, 89, 55, 64, 39	50, 114, 150, 130, 35, 29, 18, 107, 75, 105, 52, 84, 33, 135, 103, 145, 95, 123, 70, 76, 127, 11, 7, 102, 108, 71, 144, 31, 5, 68, 16, 126, 149, 129, 131, 142, 42	43, 27, 36, 85, 15, 140, 1, 125, 25, 91, 143, 147, 74, 38, 17, 117, 13, 66, 116, 118, 46, 22, 40, 148	67, 83, 152, 3, 109, 28, 90, 133, 63, 98, 137, 44,37, 51, 113, 24, 14	32, 151, 119, 99, 4, 61, 79, 41, 65, 112, 34

Tableau. Les familles intervenant dans les différentes classes de la teneur en sucres solubles

Classes	<15	15-22	22-35	35-50	50-80	80-100	>100
Familles demi-frères de luzerne	26, 154, 136, 111, 89, 17, 119, 9, 93, 36, 29, 53, 128, 37, 82, 117, 104	78, 35, 18, 98, 65, 84, 120, 135, 67, 2, 110, 19, 5, 49, 39, 54, 97, 48, 138, 28, 139,122, 114	147, 132, 121, 75, 60, 30, 141, 151, 81, 107, 34, 113, 4, 51, 52, 127, 8, 137, 21, 68, 102, 46, 62, 146, 101, 14, 1	13, 112, 47, 12, 152, 94, 92, 64, 88, 41, 44, 86, 23, 149, 125, 115, 83, 61, 38, 116, 6, 72, 124, 27, 58, 33, 140, 96	55, 45, 10, 32, 22, 69, 100, 105, 133, 144, 143, 70, 73, 123, 108, 50, 57, 74, 142, 40, 43, 63, 91, 15, 99, 77	20, 126, 16, 95, 129, 7, 145, 66, 42, 106, 148, 130, 11, 134, 118, 79, 103	3, 76, 25, 80, 31, 59, 87, 71, 150, 109, 153, 90, 131, 56, 24, 85

Tableau. Les familles intervenant dans les différentes classes de la teneur en proline

Classes	<5	5-9	9-12	12-20	20-25	25-45	>45
Familles demi-frères de luzerne	138, 88, 66, 34, 3, 68, 77, 11, 28, 118, 46, 37, 152, 5, 94, 7	112, 38, 12, 31, 44, 49, 13, 64, 117, 139, 43, 48, 67, 98, 56, 113, 26, 81	116, 65, 70, 59, 127, 119, 2, 126, 92, 121, 29, 106, 95, 62, 6, 146, 39, 99, 79, 143, 16, 55, 22, 125, 15	133, 14, 84, 75, 41, 40, 80, 108, 61, 114, 87, 142, 149, 93, 20, 73, 134, 82, 124, 58, 123, 27, 50, 135, 111, 102, 109, 107, 53, 140, 18, 8, 129, 57, 35, 30	97, 130, 33, 131, 25, 101, 91, 120, 76, 60, 72, 153, 63, 51, 1, 47, 36, 110, 71, 147, 144, 42, 90, 32	85, 52, 103, 9, 151, 83, 86, 148, 137, 141, 105, 4, 115, 128, 45, 145, 10, 24, 21, 78, 74	54, 132, 154, 17, 150, 104, 96, 23, 122, 89, 19, 69, 100, 136