

VALORISATION D'UNE *HETEROSPOROUS LEPTOSPORANGIATE* COMME SOLUTION NUTRITIF EN SUBSTITUTION D'ENGRAIS HYDROPONIQUE

BRAHIMI Latifa^{1*}, MESSAOUDI Khadidja¹, LETEIF Amina¹ et DJAZOULI Zahr-Eddine¹

1. Laboratoire de biotechnologie des productions végétales, Département de Biotechnologie et Agro-Écologie, Faculté des Science de la Nature et de la Vie, Université Saad DAHLEB, Blida 1, B.P. 270, route de Soumaa, Ouled Yaich, Blida, Algérie.

Reçu le 31/01/2023, Révisé le 18/11/2023, Accepté le 11/12/2023

Résumé

Description du sujet : Procéder au remplacement périodique d'eau appauvrie en engrais chimique, ajouté aux rejette d'eau polluée en sels et cristaux chimiques issus des restes de solutions nutritives, est le principal coût récurrent de l'hydroponie.

Objectifs : Dans cette optique, nous nous sommes intéressés de mettre en valeur le potentiel biofertilisant d'une fougère aquatique permettant ainsi, la substitution d'engrais de synthèse.

Méthodes : La conduite à l'essai était sous condition semi-contrôlée, avec cinq blocs expérimentaux contenant respectivement trois concentrations d'extraits aqueux d'*Azolla filicoloide* en comparaison avec un bloc contenant un engrais chimique et un bloc témoin. Une estimation des paramètres phytochimiques et morphologiques sur les plants de *Cucumis sativus* ont été réalisés chaque semaine.

Résultats : Les résultats ont démontrés le succès des extraits aqueux avec, notamment à la dose 6ml/l. Ceci nous était confirmé sur presque l'ensemble des paramètres étudiés, notamment celle de la partie aérienne, ainsi que sur les paramètres phytochimique dont la chlorophylle, la proline et surtout les acides aminés.

Conclusion : Le succès des extraits aqueux face à un engrais de synthèse, consolide l'idée de s'investir dans la biomasse aquatique comme biofertilisant pour une agriculture durable.

Mots clés : Biostimulants, Biofertilisants, Extrait aqueux, Phytochimie, Biomasse

VALORIZATION OF AN *HETEROSPOROUS LEPTOSPORANGIATE* AS A NUTRITIF SOLUTION IN SUBSTITUTION OF HYDROPONIC FERTILIZER

Abstract

Description of the sujet: Performing the periodic replacement of water depleted in chemical fertilizer, added to the rejection of water polluted in salts and chemical crystals resulting from the remains of nutrient solutions, is the mainest recurring cost of hydroponics.

Objective : With this in mind, we were interested in highlighting the fertilizing potential of an aquatic fern, thus allowing the substitution of synthetic fertilizers.

Methods : The conduct of the trial was under semi-controlled conditions, with five experimental blocks containing, respectively, three concentrations of aqueous extracts of *Azolla filicoloide* in comparison with the block containing chemical fertilizer and control block, estimation of phytochemical parameters and morphology on the plans of *Cucumis sativus* took place every week.

Results : The results demonstrated the success of aqueous extracts, in particular at a dose of 6ml/l. Almost all the parameters studied, particularly, the aerial part, and specially on phytochemical parameters including chlorophyll, proline and especially amino acids.

Conclusion : The success of aqueous extracts in the face of synthetic fertilizers consolidates the idea of investing in aquatic biomass as a biofertilizer for sustainable agriculture.

Keywords: Biostimulants, Biofertilizers, Aqueous extract, Phytochemistry, Biomass

*Auteur correspondant: BRAHIMI Latifa, E-mail: brahimi_latifa@univ-blida.dz

INTRODUCTION

Le coût des engrais et des amendements chimiques ainsi que la fluctuation notoire des prix des productions agricoles sur le marché mondialisé placent les producteurs dans une situation de grande pression et vulnérabilité économique. Ainsi et pour rependre à cette problématique, nous devons tourner vers de nouvelles solutions, notamment les produits naturels communément appelés biofertilisants utilisés comme engrais biologique pour une agriculture durable présentant un impact environnemental et sanitaire positif tout en préservant la biodiversité naturelle.

Des chercheurs du monde entier ont mené des études approfondies pour déterminer l'efficacité des biofertilisants sur un large éventail de cultures dans différents écosystèmes [1], dans cette optique, une fougère aquatique intéressante du genre *Azolla sp* originaire des régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes d'Afrique, d'Asie et Amériques est largement étudiée [2, 3]. Les biofertilisants contenant cette fougère entraînent une hausse considérable de la teneur en azote des sols. Outre son utilisation comme biofertilisant et comme aliment pour le bétail, l'*Azolla*, la « mine d'or vert » de la nature, est également utilisée comme médicament, comme purificateur d'eau, comme nourriture humaine et pour la production de biogaz. [4]. Ainsi, notre objectif était d'estimer l'effet bonifiant de l'extrait aqueux d'*Azolla filicoloide* sur le métabolisme de *Cucumis sativus* en hors sol, et tester son efficacité

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Préparation des extraits aqueux

Les récoltes hebdomadaire du fourrage aquatique avaient subi un séchage afin d'être réduit en poudre, introduites en eau, et mis en agitation pendant 72. Les macérât était centrifugés à 2800tr/min pendant 20 minutes. Les surnageant était ainsi récupérés puis conservés à l'obscurité et à basse température afin de subir des dilutions.

2. Description du système hydroponique adopté

L'expérimentation est assurée par un système de culture fermé NFT de cinq compartiments identiques. où chaque compartiment est constitué par un réservoir de la solution nutritive a capacité de 45 L, des conteneurs de 80mm de diamètre assurant le placement des

gobelets contenant les plantules sur un substrat de bille d'argile, des tuyaux d'irrigation qui assurent l'alimentation et la distribution de la solution nutritive et d'une pompe de 3 mètre de capacité. L'argile expansée possède un bon pouvoir isolant, ce qui est nécessaire pour protéger les racines des changements de température en plus de sa haute capacité de rétention d'eau et sa bonne aération.

3. Conduite de l'essai

Le dispositif comportait 5 blocs expérimentaux, avec 15 unités allouées pour chaque, où le premier bloc comportait un traitement témoin à l'eau, cependant, les extrait aqueux avec les doses respectives de 3ml/l, 6ml/l et 9ml/l. ont été dédiés respectivement au deuxième, troisième et quatrième bloc. Enfin, le dernier renferme un biofertilisant homologué à base d'extraits d'algues brunes (des espèces *Laminaria*, *Fucus*, *Macrocystis*, entre autres) au nom d'Algin, a été appliqué à la dose de 3ml/l. L'apport des traitements est renouvelé chaque décade durant toute la période d'étude. Avant chaque apport des prélèvements végétatifs sont réalisés de façon hebdomadaire de chaque blocs, afin d'estimer la surface foliaire ainsi que la fluctuation des métabolites primaires et secondaires.

4. Estimation de la surface foliaire

Les feuilles sont prises des mêmes niveaux à partir des plants des différents blocs et elles ont été étalées sur un papier millimétré. Les photos prise par un téléphone Smartphone ont été traitées par le logiciel Image DIGIMIZER Afin d'évaluer la surface foliaire.

5. Dosages et quantification des métabolites au niveau des feuilles

5.1. Chlorophylles a, b, caroténoïde et chlorophylle totale

La méthode proposée par Lichtenthaler [5], a été utilisé pour mesurer la chlorophylle et les caroténoïdes. Feuilles fraîches (0,1 g) ont été mélangés à 4 ml 80 % d'acétone et centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. l'absorbance du surnageant a été lu à 647, 664, et 470 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, et la chlorophylle a, la chlorophylle b, caroténoïdes, et le contenu en chlorophylle totale, respectivement, ont été déterminés comme suit: $Chla = 12,21 (A664) - 2,79(A647)$; $Chlb = 21,21 (A647) - 5,1 (A664)$; $Caroténoïdes = (1000 \times A470 - 1,8 \times Chla - 85,02 \times Chlb) / 198$; $ChIT = Chla + Chlb$

5.2. Sucres totaux

Les sucres solubles totaux sont dosés par la méthode de Dubois et al. [6]. La matière végétale est mise en contact avec de l'éthanol à 80% durant 48 heures. La solution éthanoïque est évaporée à chaud. Le résidu sec obtenu est additionnée à un mélange de phénol à 5% et d'acide sulfurique concentré. Après immersion au bain-marie, la lecture de la densité optique se fera à 485 nm au bout de 10 mn.

5.3. Acides aminés solubles et proline

L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite par Naidu [7]. Les échantillons ont été placés dans des tubes de centrifugation contenant 5ml d'un mélange (méthanol : chloroforme : eau) (60 : 25 : 15 ml). Les tubes scellés ont été chauffés au bain marie (60°C) durant 2 h et centrifugés à 5000 G pendant 10 mn. Le surnageant a servi ensuite aux dosages des acides aminés solubles par une solution tampon acide acétique /acétate de sodium (pH=4,3) et 1ml de Ninhydrine (5% dans l'éthanol) ont été additionnés à 1ml de surnageant. Les échantillons ont été agités puis chauffés au bain marie (95°C) pendant 15mn. L'absorbance des essais a été déterminée à 570nm. La proline a été déterminée par une méthode développée par Singh [8]. 1ml de surnageant, 4ml de solution de Ninhydrine, 4ml d'acide acétique glacial et 1ml d'eau distillée sont placés dans des tubes de centrifugation de 10 ml. Ce mélange a été chauffé au bain marie (90°C) pendant 45mn et refroidi à la température ambiante. L'absorbance a été lue à 520 n.

5.4. Flavonoïdes

La méthode utilisée pour l'estimation du taux de flavonols est celle décrite par Kosalec [9]. Elle consiste à mettre 0,50 ml d'extrait de la plante dans un tube à essai ; ajouter 1,5 ml d'éthanol, 0,1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 10 % puis 0,1 ml d'acétate de sodium et 2,8 ml d'eau. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lu à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 415 nm.

6. Analyses statistique

Lorsque le problème est de savoir si la moyenne d'une variable quantitative varie significativement selon les conditions,

il est préconisé de réaliser une analyse de variance. Dans les conditions paramétriques (ANOVA pour Analysis of Variance),

la distribution de la variable quantitative doit être normale. Dans certains cas, une transformation logarithmique a été nécessaire afin de normaliser cette distribution. Dans les cas où plusieurs facteurs sont en jeu, il peut arriver que toutes les interactions entre facteurs ne soient pas pertinentes à tester. Nous avons alors utilisé le modèle linéaire global (G.L.M.). Les analyses de la variance sont faites sur des moyennes homogènes adoptées sur la base d'un coefficient de variance (C.V.<15%). La signification des comparaisons des moyennes a été confirmée par un test de comparaison par paire (Test Tukey). Les contributions significatives retenues sont au seuil d'une probabilité de 5%, les calculs ont été déroulés par le logiciel SYSTAT vers. 12. [10, 11].

RÉSULTATS

Le présent travail porte sur l'évaluation de l'effet comparés entre deux fertilisants biologiques à savoir les extraits aqueux de la fougère aquatique (*Azolla filicoloïde*), et un fertilisant homologué Algin sur les traits de croissance et l'activité phytochimique de *Cucumis sativus*, en conditions semi-contrôlées sous serre.

1. Étude comparée de l'effet des biofertilisants sur la surface foliaire

Les résultats de l'analyse de la variance et du test de Tukey montrent que les traitements aux biofertilisants ont un effet significatif sur la surface foliaire des plants de *C. sativus* ($p=0,00002$, $p<1\%$) (Fig. 1). Cependant, il ressort que l'extrait aqueux pour la dose D2 (6ml/l) provoque l'augmentation la plus importantes en surface foliaires (groupe homogène a), suivit par la dose D1 (3ml/l) (groupe homogène b) puis la dose D3 (9ml/l) (groupe homogène c). Le biofertilisant Algin et le témoin (D0) engendrent des évolutions en surfaces foliaires nettement moins importantes (groupe homogène d).

2. Effet des biofertilisants sur l'expression des métabolites primaires

Les fluctuations hebdomadaires des chlorophylles a, b et totale sous l'effet du rythme d'apport des différents types de biofertilisants sont consignées ci-dessous, où les chlorophylles a et b expriment les mêmes fluctuations et affichent ses concentrations les plus importantes pour la D2 (6ml/l) suivis par la D3 (9ml/l) puis la D1 (3ml/l).

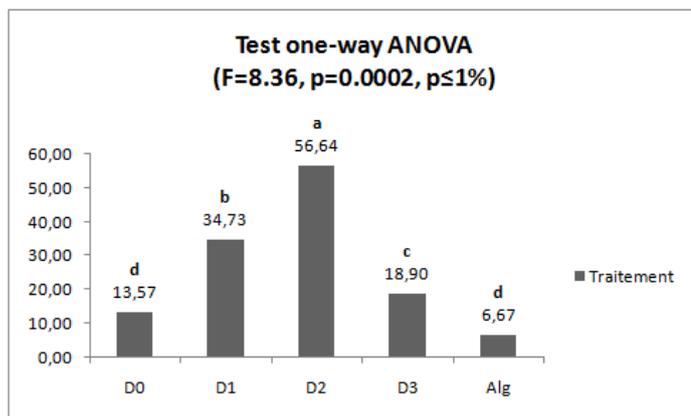


Figure 1 : Effet des biofertilisants sur la surface foliaire (Alg=Algin 3ml/l ; D0=Témoin ; D1=3ml/l ; D2=6ml/l ; D3=9ml/l)

Les plus faibles concentrations sont exprimées avec l'Algin (3ml/l). Cependant les fluctuations temporelles les plus élevées pour ces mêmes métabolites sont affichées dès la troisième et se maintiennent jusqu'à la cinquième semaine. Les plus faibles concentrations sont exprimées dans les deux dernières semaines (semaines 6 et 7) (Fig. a et b2). Pour la chlorophylle totale, les concentrations les plus élevées sont exprimées à la dose D3, suivis par les deux doses D1 et D2, le témoin (D0) affiche les concentrations les plus faibles. Les fluctuations temporelles les plus importantes sont exprimées par les trois dernières semaines, alors que les plus faibles concentrations appartiennent aux deux premières semaines (Fig. c2).

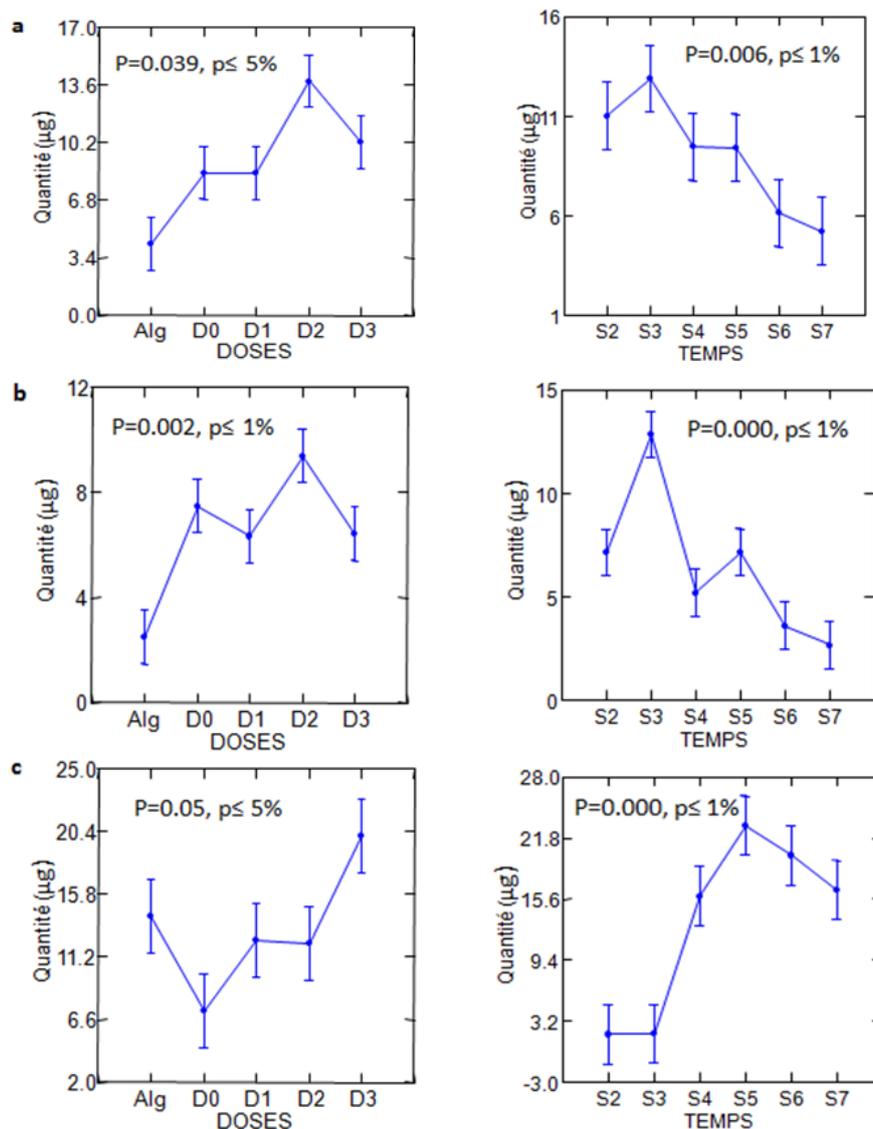


Figure 2: Effet des biofertilisants sur la fluctuation temporelle de la chlorophylle a (a), chlorophylle b (b), et la chlorophylle totale (c) (Alg=Algin 3ml/l ; D0=Témoin ; D1=3ml/l ; D2=6ml/l ; D3=9ml/l, S= semaine).

L'expression photosynthétique (caroténoïdes) ne témoigne d'aucun effet significatif des deux facteurs étudiés, à savoir les différentes doses de

biofertilisants et le temps de croissance avec les probabilités respectives de $p=0,85$ et $0,38$ ($p>5\%$) (Fig. 3).

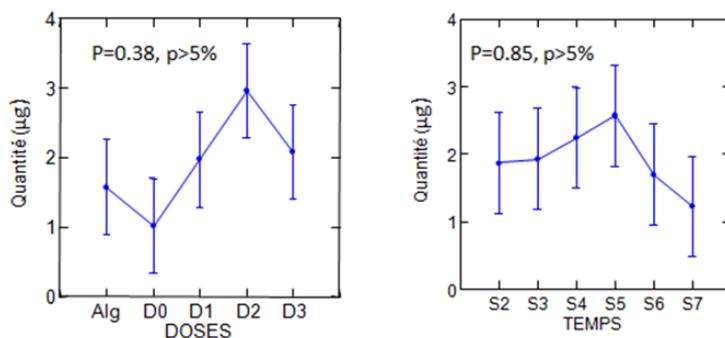


Figure 3: Effet des biofertilisants sur la fluctuation temporelle des caroténoïdes

(Alg=Algin 3ml/l ; D0=Témoin ; D1=3ml/l ; D2=6ml/l ; D3=9ml/l, S= semaine).

Les résultats de l'analyse de la variance et du test de Tukey expriment un effet temporel significatif sur les fluctuations en carbohydrates de *C. sativus* ($p=0,004$, $p<5\%$), où les valeurs les plus importantes sont exprimées durant la deuxième et la troisième semaine (groupe homogène a) suivis par la quatrième, cinquième et septième semaine (groupe homogène b) avec la valeur la plus faible pour la sixième semaine (groupe homogène c) (Fig. 4).

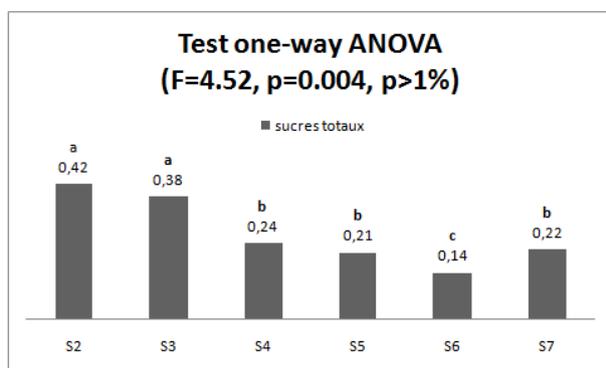


Figure 4 : Effet des biofertilisants sur la fluctuation temporelle des sucres totaux

(s=semaines).

2.1. Effet des biofertilisants sur l'expression des métabolites secondaire

La soumission des concentrations en flavonoïdes au modèle générale linéaire affiche clairement que la biofertilisation exprime nettement un effet hautement significatif ($p=0,00$, $p\leq 1\%$). Contrairement au facteur temps, qui n'exerce aucun effet significatif sur les fluctuations des flavonoïdes ($p=0,61$, $p>5\%$). Les concentrations les plus importantes s'expriment à la troisième semaine suivie par la deuxième semaine. Cependant, la meilleure dose est la dose D2 suivie par la dose D1, alors que le biofertilisant homologué Algin exprime les plus faibles concentrations (Fig. 5).

Les concentrations en proline les même tendances que celle des flavonoïdes et affiche nettement l'intérêt des extrait aqueux avec un effet hautement significatif ($p=0,00$, $p\leq 1\%$), contrairement au facteur temps qui n'exprime aucun effet significatif sur les fluctuations de la proline ($p=0,24$, $p>5\%$), mais affiche plus de concentration pour la troisième et la sixième semaine (Fig. 5).

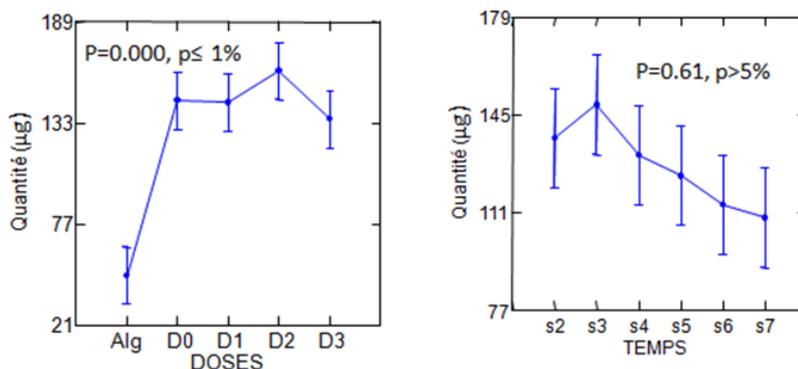


Figure 5: Effet des biofertilisants sur la fluctuation temporelle des flavonoïdes

(Alg=Algin 3ml/l ; D0=Témoin ; D1=3ml/l ; D2=6ml/l ; D3=9ml/l, S= semaine).

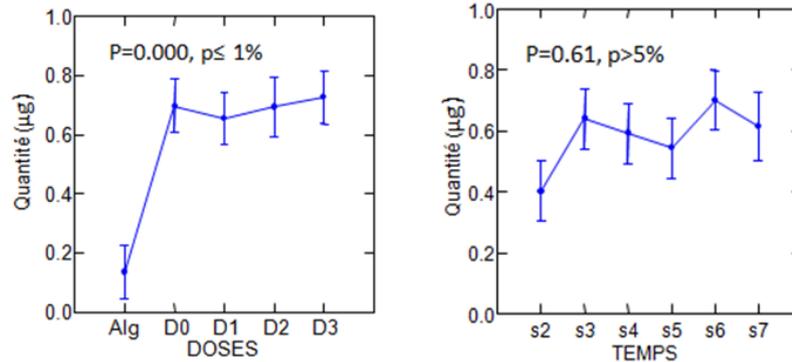


Figure 5: Effet des biofertilisants sur la fluctuation temporelle de la proline

(Alg=Algin 3ml/l ; D0=Témoin ; D1=3ml/l ; D2=6ml/l ; D3=9ml/l, S= semaine).

La soumission des concentrations en acides aminés au modèle générale linéaire exprime affiché clairement que la fertilisation biologique pratique nettement un effet hautement

significatif ($p= 0,00, p\leq 1\%$), ainsi que le facteur temps qui exerce aussi le même effet significatif sur les fluctuations des acides aminées ($p= 0,24, p>5\%$).

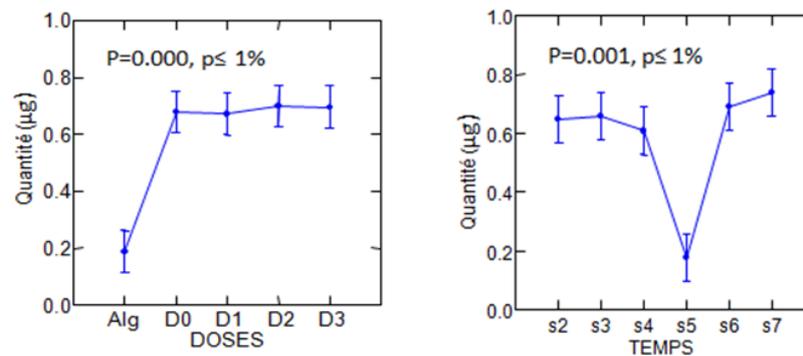


Figure 6 : Effet des biofertilisants sur la fluctuation temporelle des acides aminés

(Alg=Algin 3ml/l ; D0=Témoin ; D1=3ml/l ; D2=6ml/l ; D3=9ml/l, S= semaine).

DISCUSSION

Malgré l'importance de l'azote pour la croissance des plantes et son abondance dans l'atmosphère terrestre, seulement un petit nombre de plantes peuvent l'absorber directement, à ce fait la concentration élevée de l'*Azolla* en azote fait d'elle un excellent biofertilisant [12]. En effet grâce aux hétérocystes contenus dans les cellules d'*Azolla sp* qui sont des sites fixatrices de l'azote atmosphérique, la plante d'*Azolla sp* fixe et accumule de l'azote qu'elle transforme en ammoniacque [13]. Enfin, l'azote trouve son intérêt depuis le stade germinatif, en forme de réserves protéiniques que consomment les plantules lors de leurs germination.

Sur le plan phytochimiques, nos résultats portés sur les paramètres métaboliques, expriment clairement un effet significatif des extraits

aqueux d'*Azolla* sur la surface foliaire, la production en sucre et notamment sur les taux des chlorophylles. De même Boulechraf [14], signale que l'azote a indirectement une action sur la fabrication des glucides, par l'augmentation du nombre de chloroplastes dans les cellules et de même assurer une bonne multiplication cellulaire.

Les concentrations en acides aminés exprime un lien très significatif avec les deux facteurs étudiés, et confirme l'effet stimulateur de l'extrait aqueux pour les 4 dilutions testées. Des concentrations élevées se sont traduites le long de la période de croissance étalée sur les deux moi d'étude, à l'exception de la cinquième semaine qui coïncide avec la période de floraison.

Des concentrations avoisinantes s'expriment pour la proline mais qui ne traduit aucun effet significatif dans le temps, du fait que la synthèse de proline n'est pas liée au stade de développement mais plutôt au stress subi par la plante, dont les températures élevées. Dans la même idée, Ben Rejeb et al. [15], déclare que l'accumulation de la proline signifie qu'il y a des contraintes environnementales : (la température élevées en juin et juillet), le stress saline (l'eau d'irrigation de la station) (le pH de chaque bloc). Il ajoute que la proline est l'une des solutés la plus fréquemment accumulée en réponse à des contraintes environnementales variées et joue un rôle important dans la tolérance des plantes. Le même auteur laisse supposer que la biofertilisation par l'*Azolla* augmente la tolérance des plantes contre le stress.

Plusieurs facteurs environnementaux modulent la voie de biosynthèse des flavonoïdes, Mori et al. [16] ont montré que le profil d'accumulation des flavonoïdes notamment les anthocyanes est modifié à des températures élevées. Lorsque les plantes sont exposées à des faibles températures, une accumulation des anthocyanes est observée. [17]. Il serait aussi particulièrement intéressant de s'arrêter sur l'impact de la disponibilité en azote sur la biosynthèse des flavonoïdes, où une carence azotée favorise la biosynthèse des flavonoïdes chez diverses espèces [18]. Cependant, les mécanismes moléculaires de la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes en réponse à une fertilisation azotée ne sont pas encore totalement élucidés.

Sur la base des propos suscités par Mori et al. [16] et Scheible [18], on peut attribuer les fortes baisses des concentrations en flavonoïdes à partir de la quatrième semaine, aux températures élevées sous serre notamment en mois de juillet ainsi qu'à l'apport azoté important présent dans les extraits aqueux d'*Azolla filicoide*.

CONCLUSION

Wagner [19] nome l'*Azolla* "une mine d'or verte". Ce fait ne peut être ignoré en ce qui concerne sa substitution aux engrais inorganiques pour but de maintenir une agriculture durable de qualité et de quantité.

Les découvertes des précédentes études concordent avec les résultats des études préliminaires et principales présentées dans cet article concernant l'effet comparé des extraits d'*Azolla filicoide* avec un biofertilisant homologué (Algin) sur les traits de croissance de *Cucumis sativus*, en conditions semi-contrôlées, et justifierait l'utilisation d'*Azolla filicoide* comme biofertilisant dans les sols pauvres en éléments nutritifs. Le choix de la culture et de dispositif expérimental adéquat, nous a permis d'accentuer la lumière sur l'intérêt de la biomasse végétale invasif notamment la fougère aquatique *Azolla filicoide* en tant que biofertilisant capable de substituer l'apport d'engrais minérale pour un meilleur respect de l'environnement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1].Symnaczik, S., Mäder, P., Romano, I. 2022. Biofertilisants. FiBL, University Neapel Federico II, 1240:1-13.
- [2].Mosh, S.S. A. 2018. Review on significance of azolla meal as a protein plant source in finfish culture. *J. Aquac. Res., Dev.*, 9:1000544.
- [3].Rashed, S., 2021. An overview on the aquatic fern *Azolla* spp. as a sustainable source of nutrients and bioactive compounds with resourceful applications. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries Zoology Department*, 25(1): 775-782.
- [4].Roy, D. C., Pakhira, M. C., and Bera, S. 2016. A review on biology cultivation and fertilization of *Azolla*. *Adv. Life Sci.*, 5(1), 11-15, 2016.
- [5].Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- [6].Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28(3):350-356.
- [7].Naidu, B.P., Cameron, D.F., Konduri, S.V., 1998. Improving drought tolerance of cotton by glycine betaine application and selection. Proceedings of the Australian Agronomy Conference, July 20-23, 1998, The Australian Society of Agronomy, Australia
- [8].SINGH, T. N., PALEG, L. G., ASPINALL, D. 1973. Stress metabolism. III Variations in response to water deficit in barley plant, *Aust. J. Biol. Sci.*, 26: 65-67
- [9].Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., Vladimirovic S. 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia, *Acta. Pharm.*; 54: 65-72.
- [10].Systat Software Inc., 2007. Systat 12. Systat Software, Inc. San Jose, CA.

- [11].Bahimi, L., Benchohra, H., Djazouli, Z.E. 2013. Principe de choix alimentaire chez les adultes du bupreste noir *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae) entre deux espèces de *Prunus* (*Prunus mahaleb* et *Prunus domestica*) dans la région de Médéa (Algérie), *Revue Agrobiologia*, 4; 47-53.
- [12].Liu, C. B., Guo, H. (2021). Azolla incorporation under flooding reduces grain cadmium accumulation by decreasing soil redox potential. *Scientific Reports*, 11(1): 6325.
- [13]. Maria Andrea, K., Paul, L. Vlek. G. 2007. Azolla, une technique d'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote, Agriculture & développement rural, Zentrum für Entwicklungsforschung (Centre d'études pour le développement) Bonn, Allemagne.
- [14]. Boulechraf, B. 2018. Culture hydroponique de l'orge. Master univ. Frères MENTOURI Constantine, sp. Biotechnologie et Génomique végétale, 41p.
- [15].Ben Rejeb K., Abdely C. et Savouré A., 2012. La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. *Biologie Aujourd'hui*, 206 (4): 291-299.
- [16].Mori, K., Sato, H., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., Kobayashi, S., Sugaya, S., Gemma, H., Hashizume, K. 2015. Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. *VITIS - J. Grapevine Res.*, 44:161-165.
- [17].Pascual-Teresa, S., and Sanchez-Ballesta, M.T. (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Phytochem. Rev.*, 7:281-299.
- [18].Scheible, W., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-rojas, N.,Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., Stitt, M. 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen, *Plant Physiol.*, 136:2483–2499.
- [19]. Wagner G.M. 1997. Azolla: A Review of Its Biology and Utilization. *The Botanical Review* 63: 1-26.