Effets de champignons MA sur la croissance et le développement de plants de ricin élevés sous contrainte saline en conditions semi-contrôlées

Bassirou Diallo 1*, Samba Arona Ndiaye Samba 2 et Djibril Sane 3

¹ Unité de Recherche en Culture *In vitro*,
Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Bel-Air,
Samba, B.P. 3120, Dakar, Sénégal.

² Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture,
Université de Thiès, B.P. 967, Thiès, Sénégal.

³ Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques Université Cheikh Anta Diop, B.P. 5005, Dakar, Sénégal.

(reçu 17 Janvier 2016 – accepté le 28 Mars 2016)

Résumé – Contexte- La salinité constitue un des principaux facteurs abiotiques limitant la croissance et le rendement des espèces végétales. Les champignons Mycorhizes Arbusculaires, 'MA' peuvent réduire les pertes de rendement des végétaux soumis au stress salin. Objectif- Cette étude a été menée pour évaluer les effets des champignons MA (Glomus aggregatum: Ga, G. fasciculatum: Gf, G. intraradices: Gi, G. mosseae: Gmo, Glomus spp: Gspp et G. verriculosum: Gv) sur le développement de plants de ricin élevés sous contrainte saline. Méthodologie et Résultats- Les plants ont été cultivés en serre durant 4 mois sous différentes contraintes salines (NaCl à 0 ; 50 et 100 mM). Les résultats ont montré que la mycorhization améliore la croissance et le développement des plants de ricin soumis à un stress salin. En présence de NaCl 50 mM, l'accession 1 présente un développement significativement plus important avec Glomus spp. Par contre, c'est en présence de Glomus intraradices que les plants de l'accession 7 présentent une meilleure croissance. Conclusion et Application- Les champignons MA permettent d'optimiser la productivité des plants de ricin cultivés dans des conditions de stress salin. Ces résultats pourraient être utilisés dans les programmes de production de biocarburant et récupération des terres salées au Sénégal.

Abstract - Context- The salinity of non Consisting major abiotic who factoring limit growth and yield plant species. Arbuscular mycorrhizae fungi, 'MA' can reduce yield losses of plants submitted to salt stress. Objective- Was this study, conducted in the evaluating but mushrooms effects MA (Glomus aggregatum: Ga, G. fasciculatum: Gf, G. intraradices: Gi, G. mosseae: Gmo, Glomus spp: Gspp and G. verriculosum: Gv) on growth and development of two accessions of ricin (Acc Acc 1 and 7) under high salt stress. Methodology and Results- Were the plants grown in greenhouses during 4 months in presence of various concentrations of NaCl (0, 50 and 100 mM) included in the watering solution. The results obtained have shown that the mycorrhizal growth and improving the development of castor plants subjected to a non salin. At presence of NaCl stress at 50 mM, membership 1 this development not significantly, higher when plants are inoculated with Glomus spp. By cons, it is in the presence of Glomus intraradices what plants accession 7 june presentent growth better. Conclusion and Application-Mycorrhizal fungi optimize the productivity of castor plants grown in the salt stress conditions. These results might be used in biofuel programs and recovery of saline lands in Senegal.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza - *Ricinus communis* L. - Salt stress – Sahel.

...

^{*} bass_dialo@yahoo.fr

1. INTRODUCTION

Le ricin (Ricinus communis L.) est une euphorbiacée répandue sur tous les continents particulièrement dans les zones tropicales et subtropicales où la plante trouve les conditions environnementales les plus favorables à son développement [1]. L'espèce occupe une place singulière parmi les oléagineux, notamment en raison de sa tolérance à la sécheresse, sa robustesse par sa résistance à certaines attaques de pathogènes, son adaptation aux sols pauvres et ne présente aucune compétition avec les cultures vivrières et forestières [2]. De plus, les graines contiennent une huile riche en acide ricinoléique qui lui confère des propriétés spécifiques très recherchées [3, 4]. Selon l'IFHVP [5], l'huile de ricin possède un pouvoir calorifique évaluée à 35 528 kJ/l contre 36 687 kJ/l pour le gasoil, ce qui justifie le regain d'intérêt pour sa culture notamment au Sénégal [6]. La possibilité de cultiver le ricin sur des terres affectées par la salinité pourra contribuer à la récupération des terres dégradées au Sénégal. Pour se faire, l'association de génotypes de ricin et de champignons MA capables de favoriser la croissance et le développement des plantes à travers l'amélioration de leur nutrition hydrominérale et la production d'osmo-régulateurs [7, 8] peut être bénéfique à un tel programme. Toutefois, la sensibilité au sel apparaît généralement variable selon les génotypes et est fortement dépendante du couple symbiotique plante/champignon mychorizien [8, 9]. C'est dans cette optique que ce travail a été initié pour étudier l'inoculation de souches fongiques avec des plants issus d'accessions de graines locales de ricin afin de déterminer les couples symbiotiques permettant d'optimiser la productivité de plants de ricin placés sous contrainte saline.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel végétal

Les accessions 1 et 7 de ricin ont été classées comme tolérant au NaCl, suite à un criblage *in vitro* [10]. Les plantules obtenues après une semaine de germination des graines dans des boîtes de Petri ont été semées dans des gaines en plastique (30 cm × 20 cm) remplies de 3 kg de sol de Sangalkam (**Tableau 1**). Les souches fongiques utilisées appartiennent à la collection LCM, (IRD/ISRA/UCAD): il s'agit de: *Rhizophagus aggregatus* ou *Glomus aggregatum* (DAOM 227128), *Glomus fasciculatum* (DAOM 227130), *Glomus intraradices* (DAOM 227133), *Glomus mosseae* (DAOM 227131), *Glomus verriculosum* (DAOM 227132) et *Glomus spp* (cocktail à égale proportion des cinq souches de *Glomus* utilisées).

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques du sol de Sangalkam

Eléments composants	Teneur (100 g de sable)
Sable fin	66.5 %
Sable grossier	24.5 %
Limon fin	1.80 %
Limon grossier	2 %
Argile	5.20 %
Matière organique	0.62 %
Carbone total	0.36 %
Azote total	0.44 %
C/N ratio	8.18
Phosphore assimilable	39.55 ppm
pH (sol/eau ratio 1:2)	8.20

Source: Sarr [11]

2.2 Dispositif expérimental et paramètres mesurés

L'essai avait été conduit en serre durant 4 mois au niveau de la station de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) de Bel Air. Les plants ont été inoculés avec 20 g d'inoculum/plant une semaine après le semis des graines.

Le dispositif expérimental était totalement randomisé avec 3 facteurs: inoculum, accession et salinité. Le facteur inoculum comportait les témoins non inoculés et les plants inoculés avec *Ga*, *Gf*, *Gi*, *Gmo*, *Gv* et *Gspp*. Le facteur accession comptait 2 niveaux: accession 1 et accession 7. Le facteur salinité comptait trois niveaux de concentration de NaCl: 0, 50 et 100 mM. Le nombre de traitements était de 42 avec 12 répétitions par traitement, soit un effectif de 504 plants.

Les racines ont ensuite été colorées selon la technique de Philips *et al.*, [12]. L'examen histologique a été effectué au microscope optique au grossissement X100. L'intensité et la fréquence de la mycorhization respectivement déterminées, selon la méthode de Trouvelot [13]. Par contre, la dépendance mycorhizienne relative a été évaluée suivant la méthode décrite par Plenchette *et al.*, [14].

Les mesures relatives à la taille des plants au terme de l'expérience ont été effectuées à l'aide d'une règle graduée. Les poids secs ont été déterminés après séchage à l'étuve (80 °C) jusque le poids est constant.

Les analyses de variance sur les données mesurées ont été effectuées avec le test de Newman Keuls au seuil 5 % pour la comparaison des moyennes.

3. RESULTATS

3.1 Mycorhization

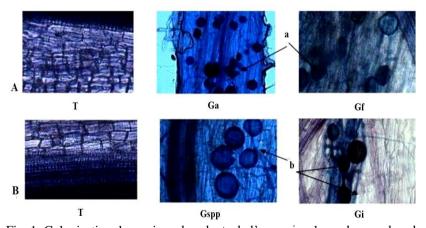


Fig. 1: Colonisation des racines des plants de l'accession 1 par des souches de champignons MA en absence de NaCl (A) et en présence de 50 mM de NaCl (B)

T (témoins non inoculés), Ga (Glomus aggregatum), Gf (Glomus fasciculatum) Gspp (coktail de souches), Gi (Glomus intraradices). vésicule (a), hyphe (b)

La présence de vésicules et d'hyphes mycéliens (caractéristique de l'établissement de la symbiose mycorhizienne) est observée chez les plants des accessions 1 et 7 inoculés et cultivés en présence comme en absence de contrainte saline (figures 1 et 2).

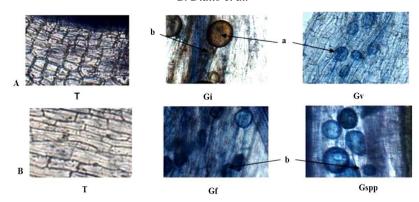


Fig. 2: Colonisation des racines des plants de l'accession 7 par des souches de champignons MA en absence de NaCl (A) et en présence de 50 mM de NaCl (B)

T (témoins non inoculés), *Gv* (*Glomus verriculosum*), *Gf* (*Glomus fasciculatum*) *Gspp* (cocktail de souches), *Gi* (*Glomus intraradices*), vésicule (a), hyphe (b)

3.2 Dépendance mycorhizienne

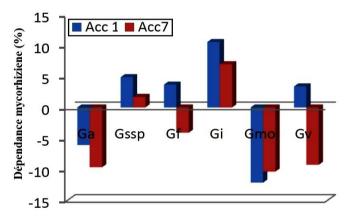


Fig. 3: Dépendance mycorhizienne relative en absence de contrainte saline des plants des accessions 1 et 7 de ricin inoculés avec six souches de champignons mycorhiziens 'MA'

Aucune dépendance mycorhizienne relative n'atteint 15 % pour l'ensemble des souches fongiques et accessions de ricin testées (figure 3). Chez l'accession 1, les valeurs de dépendance mycorhizienne relative enregistrées sont positives chez les plants inoculés avec *Glomus spp* (+4.9%), *Glomus fasciculatum* (+3.7%), *Glomus intraradices* (+10.6%) et *Glomus verriculosum* (+3.4%).

Concernant l'accession 7, les valeurs de dépendance mycorhiziennes positives ne s'observent que chez les plants inoculés avec *Glomus spp* (+1.7%) et *Glomus intraradices* (+7%).

3.3 Effet de la salinité sur l'intensité de mycorhization chez les accessions de ricin

Aucune intensité de mycorhization enregistrée ne dépasse guère 50% chez les deux accessions de ricin testées (figures 4 et 5).

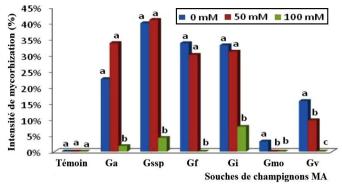


Fig. 4: Effet de six souches de champignons MA sur l'intensité de mycorhization des plants de l'accession 1 élevés durant 4 mois sous serre en présence de 0, 50 et 100 mM de NaCl

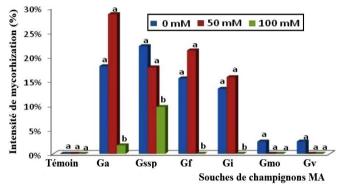


Fig. 5: Effet de six souches de champignons MA sur l'intensité de mycorhization des plants de l'accession 7 élevés durant 4 mois sous serre en présence de 0, 50 et 100 mM de NaCl

3.4 Effet de la salinité sur la fréquence de mycorhization chez les plants des accessions de ricin

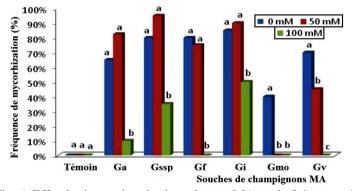


Fig. 6: Effet de six souches de champignons MA sur la fréquence de mycorhization des plants de l'accession 1 élevés durant 4 mois sous serre en présence de 0, 50 et 100 mM de NaCl

64 B. Diallo et al.

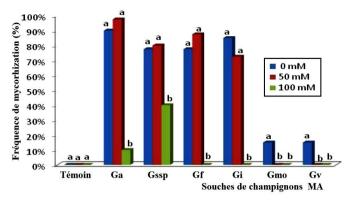


Fig. 7: Effet de six souches de champignons MA sur la fréquence de mycorhization des plants de l'accession 7 élevés durant 4 mois sous serre en présence de 0, 50 et 100 mM de NaCl

Pour l'ensemble des souches testées chez l'accession 1, la fréquence de mycorhization la plus élevée (95 %) est enregistrée avec le cocktail *Glomus spp*, 'Gspp' en présence de NaCl, à 50 mM (figure 6). Par contre, chez l'accession 7, la fréquence de mycorhization la plus importante est observée en présence de *Glomus aggregatum*, 'Ga' qui permet d'enregistrer un taux de 97.5 % en présence de NaCl, à 50 mM (figure 7).

3.5 Effet de l'inoculation sur la croissance des tiges des plants de ricin

Tableau 2: Effet de l'inoculation mycorhizienne sur la croissance en hauteur des plants de l'accession 1 après 4 mois de culture en présence de contrainte saline (50 mM)

Durée culture (jour)	T_0	T ₃₀	T_{60}	T ₉₀	T ₁₂₀			
Longueur moyenne des tiges (cm)								
Témoins	28.4 a	28.9 a	29.7 a	29.9 b	30.2 с			
Ga	29.2 a	29.6 a	30.1 a	30.3 b	30.7 c			
Gspp	29.1 a	29.9 a	30.6 a	32.5 a	33.2 a			
Gf	28.1 a	28.7 a	29.5 a	30.2 b	31.3 b			
Gi	27.7 a	28.3 a	29.2 a	30.3 b	32.2 ab			
Gmo	27.4 a	27.6 a	28.2 a	28.8 b	29.1 c			
Gv	28.5 a	29.3 a	29.9 a	30.7 b	31.5 b			

Effectif: 12 plants / condition de milieu / souche mycorhizienne Pour chaque date de mesure, les lettres **a**, **b** et **c** suivant les chiffres désignent des groupes homogènes suivant le test de Newman-Keuls au seuil de 5%.

Tableau 3: Effet de l'inoculation mycorhizienne sur la croissance en hauteur des plants de l'accession 7 après 4 mois de culture en présence de contrainte saline (50 mM)

Durée culture (jour)	T_0	T_{30}	T_{60}	T_{90}	T ₁₂₀			
Longueur moyenne des tiges (cm)								
Témoins	25.2 a	25.7 a	26.5 a	27.2 a	27.6 b			
Ga	26.3 a	26.8 a	27.3 a	27.7 a	28.1 b			
Gspp	26.5 a	27.6 a	27.4 a	28.8 a	29.5 ab			
Gf	25.7 a	27.1 a	27.4 a	27.7 a	27.9 b			
Gi	26.1 a	27.7 a	27.3 a	28.5 a	31.4 a			
Gmo	25.5 a	27.3 a	26.9 a	27.4 a	27.7 b			
Gv	24.7 a	25.2 a	26.2 a	26.7 b	27.3 b			

En présence de contrainte saline, la croissance en hauteur des plants inoculés varie suivant les accessions de ricin étudiées et les souches de champignons mycorhiziens utilisées (**Tableaux 2** et **3**).

Chez l'accession 1, *Glomus intraradices*, 'Gi' favorise la plus forte croissance des tiges avec un accroissement moyen de 16 % enregistré chez les plants inoculés avec cette souche (**Tableau 2**). Il en est de même pour l'accession 7 chez qui, cette même souche de champignon stimule un accroissement de 20 % des tiges des plants inoculés (**Tableau 3**).

Le cocktail de souches *Glomus spp*, 'Gssp' constitue celui qui stimule en seconde position le plus de la croissance des plants inoculés (**Tableaux 2** et **3**), aussi bien chez l'accession 1 (14%) que chez l'accession 7 (20%).

3.6 Production de biomasse sèche aérienne

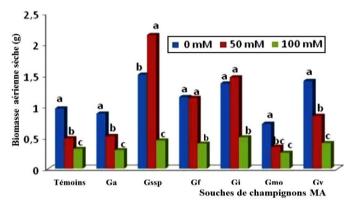


Fig. 8: Effet de six souches de champignons mycorhiziens sur la biomasse sèche aérienne des plants de l'accession 1 de ricin en présence de NaCl à 0, 50 et 100 mM, après quatre mois de culture sous serre

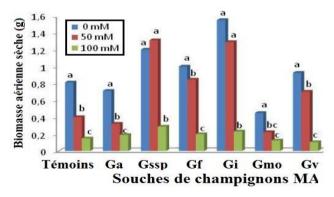


Fig. 8: Effet de six souches de champignons mycorhiziens sur la biomasse sèche aérienne des plants de l'accession 7 de ricin en présence de NaCl à 0, 50 et 100 mM, après quatre mois de culture sous serre

L'accession 1, en absence de NaCl, le poids moyen de matière sèche aérienne passe de 0.96 g chez les plants témoins à 1.51 g chez les plants inoculés avec *Glomus spp*, 'Gssp'. De même, en présence de NaCl 50 mM, la production de matière sèche aérienne passe de 0.48 g chez les plants témoins à 2.15 g chez les plants inoculés (figure 8).

Pour l'accession 7 par contre, *Glomus intraradices*, 'Gi' la production de matière sèche en absence de NaCl varie de 0.81 g chez les plants témoins à 1.55 g chez les plants inoculés. En présence de NaCl 50 mM, le cocktail de souches *Glomus spp*, 'Gss' permet d'enregistrer un gain de poids moyen de matière sèche aérienne qui varie de 0.40 g chez les plants témoins à 1.31 g chez les plants inoculés (figure 9).

4. DISCUSSIONS

4.1 Colonisation racinaire

La symbiose mycorhizienne arbusculaire caractérisée par la présence de structures typiques (vésicules, arbuscules, hyphes mycéliens) s'est bien établie chez les plants de ricin après quatre mois de culture. De telles structures ont également été observées chez d'autres euphorbiacées comme *Jatropha curcas* [15]. Ces structures attestent de leur capacité à former des associations symbiotiques avec les champignons mycorhiziens.

4.2 Dépendance mycorhizienne

Les différences observées dans les réponses des plants inoculés peuvent être liées aux propriétés morphologiques des racines de la plante, à l'efficacité des champignons MA, à la disponibilité en phosphore dans le sol [16], à l'interaction champignon/plant ou à la compatibilité champignon/milieu de culture [17].

Le degré de dépendance mycorhizienne négatif observé chez certains plants en présence de souches de champignons MA (*Glomus aggregatum, Glomus mosseae* et *Glomus verriculosum*) pourrait s'expliquer par un effet dépressif de la mycorhization sur certaines plantes [18].

4.3 Effet de la salinité sur l'intensité de mycorhization chez les accessions de ricin

Les résultats sur l'intensité de la mycorhization montrent des taux n'atteignant pas 50%, quelle que soit la souche fongique utilisée et l'accession considérée. Quilambo [18] et Diop [19] soutiennent que les faibles taux de colonisation racinaire seraient liés à la sécrétion de substances antifongiques ou à la qualité des exsudats racinaires qui inhiberaient la mise en place de l'infection mycorhizienne.

Néanmoins, quelle que soit la cause expliquant les faibles taux obtenus, Diagne *et al.* [20] soutiennent qu'il n'est pas nécessaire que le niveau d'infection soit très élevé pour être bénéfique à la plante, notamment dans les régions semi-arides.

4.4 Effet de la salinité sur le développement des plants de ricin

L'ensemble des résultats obtenus sur l'accroissement et les productions de biomasses aériennes des plants inoculés ou non révèle une effectivité différentielle des souches de champignons pour les plants des accessions de ricin étudiées. Ces résultats corroborent ceux obtenus chez *Acacia seyal* [21], l'arachide [22] et le palmier dattier [9].

Ces auteurs ont montré que l'inoculation avec des champignons 'MA' améliore la croissance et le développement des plantes cultivées sous des conditions de salinité variables. Cet effet bénéfique de la mycorhization des plantes en présence de sel serait liée à l'amélioration de leur nutrition hydrominérale et la production d'osmorégulateurs [7].

5. CONCLUSION

Nos résultats ont montré que *Glomus ssp* et *Glomus intraradices* stimulent plus la croissance et le développement des plants, aussi bien en présence qu'en absence de

NaCl, chez les accessions 1 et 7. Ces souches de champignons se sont ainsi révélées capables de limiter les effets dépressifs de la salinité et sur le développement des plants de ricin mycorhizés.

REFERENCES

- [1] V. Polvèche, 'La Culture du Ricin en Europe', Ingénieries-EAT-N°6, pp. 49 à 58, 1996.
- [2] P. Borg, G. Lê, S. Lebrun and B. Pées, 'Example of Industrial Valorisation of Derivative Products of Castor Oil', Innovation-Technologie, Oilseeds & Fats Crops and Lipids, OCL, Vol. 16 N°4-5-6, pp. 211 - 214, 2009.
- [3] L. Velasco, B.P. Rojas and M.J.M. Fernández, 'Fatty Acid and Tocopherol Accumulation in the Seeds of a High Oleic Acid Castor Mutant', Industrial Crops & Products, Vol. 22, N°3, pp. 201 206, 2005.
- [4] A.J. Zhang, G. Anyarambhatla, L. Ma, S. Ugwu, T. Xuan, T. Sardone and I. Ahmad, 'Development and Characterization of a Novel Cremophor® EL Free Liposome Based Paclitaxel (LEP-ETU) Formulation', European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 59, N°1, pp. 177 – 187, 2005.
- [5] Rapport, Institut Français des Huiles Végétales Pures, IFHVP, 'L'huile Végétale Pure Végétale', ®.Fiche Energie et Environnement, 21 p., 2005.
- [6] Rapport Programme Spécial Biocarburant, 'Nouvelle Orientation de la Politique Agricole, Plan REVA Retour vers l'Agriculture', Ministère du Développement Rural et de l'Agriculture. 24 p., 2007.
- [7] J.C. Ojala, W.M. Jarrel, J.A. Menge and E.L.V. Johnson, 'Influence of Mycorrhizal Fungi on the Mineral Nutrition and Yield of Onion in Saline Soil', Agronomy Journal, Vol. 75, pp. 255 259, 1983.
- [8] J.M. Ruiz-Lozano and R. Azc'on, 'Symbiotic Efficiency and Infectivity of an Authochthous Arbuscular Mycorrhizal Glomus Sp. from Saline Soils and Glomus Deserticola under Salinity', Mycorrhiza, Vol. 10, pp. 137 143, 2000.
- [9] I.L.D. Diatta, 'Influence de l'Inoculation avec des Champignons Mycorhiziens à Arbuscules sur la Croissance et le Développement des Plants de Cultivars de Palmier Dattier (Phoenix Dactylifera L.) Sahéliens en Conditions de Stress Salin', Thèse de Doctorat, Université Cheikh Anta Diop, Dakar. Ecole Doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de la Terre, Faculté des Sciences et Techniques, 163 p., 2013.
- [10] B. Diallo, A.N.S. Samba, D. Sané and T. Diop, 'Effet du Chlorure de Sodium sur la Germination de Graines de Ricinus communis L', International Journal of Biological and Chemical Sciences, Vol. 7, N°4, pp. 1534 1544, 2013.
- [11] A. Sarr, 'Contribution à l'Etude des Pseudomonas Fluorescents de la Mycorhizosphére de Ziziphus mauritiana Lam', Mémoire d'Etudes Approfondies, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, 51 p., 2000.
- [12] J.M. Philips and D.S. Hayman, 'Improved Procedures for Cleaning Roots and Staining Parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessement of Infection', Transaction British Mycological Society, Vol. 55, pp. 158 161, 1970.

- [13] A. Trouvelot, J.L. Kough and V. Gianinazzi-Pearson, 'Mesure du Taux de Mycorhization VA d'un Système Radiculaire. Recherche de Méthodes d'Estimation ayant une Signification Fonctionnelle', Mycorrhizae: Physiology and genetics. ESM Dijon, 1-5 July 1985, INRA, Paris, 1986.
- [14] C. Plenchette, J.A. Fortin and V. Furlan, 'Growth Responses of everal Plant Species to Mycorrhizae in Soil of Moderate P-Fertility. I Mycorrhizal Dependency under Field Conditions', Plant and Soil, Vol. 70, pp. 199 209, 1983.
- [15] Jamaluddin and A.K. Singh, 'Studies on Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Jatropha curcas L.', Mycorrhiza News, Vol. 18, N°3, pp. 12 14, 2006.
- [16] M. Habte, M.N. Byappanahalli and J. Ram, 'Response of Sauropus androgynus to Soil Phosphorus Concentration and Mycorrhizal Inoculation', Journal Plant Nutr. Vol. 17, pp. 511 521, 1994.
- [17] R.A. Hamel, F. Fernández, R.L. Ferrer and E. Furrazola, *'Soil-Strain Compatibility: The Key to Effective Use of Arbuscular Mycorrhizal Inoculants?'*, Mycorrhiza, Vol. 21, N°3, pp. 183 193, 2011.
- [18] O.A. Quilambo, *'The Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis'*, African Journal of Biotechnology, Vol. 2, N°12, pp. 539-546, 2003.
- [19] T. Diop, 'Les Mycorhizes à Vésicules et Arbuscules', Journal de la Faculté des Sciences de Dakar, Université. Cheikh Anta Diop, Vol. 2, pp. 49 64, 1996.
- [20] O. Diagne et K. Ingleby, 'Ecologie des Champignons Mycorhiziens Arbusculaires Infectant Acacia raddiana', In: Un arbre au Désert. Paris, IRD Editions, pp. 205 228, 2008.
- [21] A.G.B. Manga, 'Biodiversité des Champignons Mycorhiziens Arbusculaires d'Acacia seyal del. et Evaluation de leurs Potentialités Symbiotiques en Milieu Salé', Thèse de Doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 118 p., 2005.
- [22] A.S. Al-Khaliel, 'Effect of Salinity Stress on Mycorrhizal Association and Growth Response of Peanut Infected by Glomus mosseae', Plant Soil Environment, Vol. 56, N°7, pp. 318 324, 2010.